



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

**UTILIDADE DOS ÁCIDOS GORDOS DOS ERITRÓCITOS COMO
BIOMARCADORES DOS ÁCIDOS GORDOS DO MÚSCULO EM BOVINOS**

MARTA SEGURO PAIVA DA SILVA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Presidente

Doutor José Pedro da Costa Cardoso
de Lemos

Vogais

Doutor José António Mestre Prates
Doutora Teresa de Jesus Silva Matos
Doutor Rui José Branquinho Bessa

ORIENTADOR

Doutor Rui José Branquinho
Bessa

CO-ORIENTADOR

Doutor José António Mestre
Prates

2013

Lisboa



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

**UTILIDADE DOS ÁCIDOS GORDOS DOS ERITRÓCITOS COMO
BIOMARCADORES DOS ÁCIDOS GORDOS DO MÚSCULO EM BOVINOS**

MARTA SEGURO PAIVA DA SILVA

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM ENGENHARIA
ZOOTÉCNICA/PRODUÇÃO ANIMAL**

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Presidente

Doutor José Pedro da Costa Cardoso
de Lemos

Vogais

Doutor José António Mestre Prates
Doutora Teresa de Jesus Silva Matos
Doutor Rui José Branquinho Bessa

ORIENTADOR

Doutor Rui José Branquinho
Bessa

CO-ORIENTADOR

Doutor José António Mestre
Prates

2013

Lisboa

RESUMO

UTILIDADE DOS ÁCIDOS GORDOS DOS ERITRÓCITOS COMO BIOMARCADORES DOS ÁCIDOS GORDOS DO MÚSCULO EM BOVINOS

Atualmente, a carne de bovinos tem recebido particular atenção decorrente da sua gordura apresentar uma composição rica em ácidos gordos saturados e *trans* e ser pobre em gorduras polinsaturadas, tendo sido identificada como fator de risco de várias doenças importantes tais como doenças vasculares, obesidade, diabetes tipo 2 e inúmeros cânceres. De modo a atender às recomendações nutricionais que recomendam limites para a ingestão de ácidos gordos saturados e *trans* tem-se procurado desenvolver estratégias produtivas para melhorar a composição de ácidos gordos (AG) na carne. O objetivo deste trabalho consiste em explorar a possibilidade de prever AG da carne através dos AG dos eritrócitos, abrindo assim perspectivas para monitorização *ante-mortem* das estratégias nutricionais que visam melhorar o valor nutricional da fração lipídica da carne. As estratégias de produção e controlo de qualidade destes produtos ganharia muito com o desenvolvimento de métodos não invasivos de previsão *ante-mortem* da composição em AG da carne como o CLA e 18:1 *trans-11*, 18:3 n-3 e total de n-3 PUFA.

Os resultados demonstram o potencial de prever a composição de alguns ácidos gordos da carne, como o CLA 18:1 *trans-11*, 18:3 n-3 e total de n-3 PUFA, a partir da informação dos ácidos gordos dos eritrócitos. Verificamos que a inclusão da informação detalhada dos isómeros de CLA obtida por HPLC melhora substancialmente as equações de regressão linear múltipla obtidas na previsão da composição do perfil de AG do músculo.

Palavras-chave: Ácidos gordos saturados, Ácidos gordos *trans*, Ácido linoleico conjugado, Carne bovina, Eritrócitos

ABSTRACT

UTILITY OF THE FATTY ACID OF ERYTHROCYTES AS BIOMARKERS MUSCLE FATTY ACID COMPOSITION IN BEEF

Beef is getting increasing negative attention due its high content on saturated fatty acids (SFA) and *trans* fatty acids (TFA) and its low content of polyunsaturated fat. were identified as a possible cause of many types of important diseases. Actual human nutritional recommendations establish a limit to saturated fatty acids and *trans* fatty acids intake. Thus, animal production studies are being developed to try to find production strategies to improve meat's fatty acids profile. The main goal of the present work is to explore the possibility of forecasting meat's fatty acids compositions based on fatty acid composition of erythrocytes, enabling *ante-mortem* monitorisation of target production objectives. Blood and meat samples of 40 male young bull were used to study the fatty acid profile of erythrocytes and muscle lipid fractions. Fatty acids were analysed by gas chromatography and liquid chromatography. Multiple regressions analysis were used to explore the prediction potential of this approach.

The results showed that it is possible to forecast some fatty acids composition, such as CLA, 18:1 *trans-11*, 18:3 n-3 and total de n-3 PUFA, from the information gathered from fatty acids of erythrocytes, particularly when detailed information about the CLA isomeric profile in erythrocytes were used.

KeyWords: Saturated fatty acid, *Trans* fatty acid, Conjugated linoleic acid, Beef, Erythrocytes

ÍNDICE GERAL

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÍNDICES.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
ÍNDICE DE TABELAS.....	vi
INTRODUÇÃO.....	vii
ABREVIATURAS.....	vii

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
1.1 COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GORDOS DA CARNE E EFEITOS NA SAÚDE DO CONSUMIDOR.....	3
1.1.1 Constituição da carne.....	3
1.1.2 Ácidos gordos e efeitos na saúde.....	3
1.1.3 Ácido linoleico conjugado.....	7
1.1.4 Consumo de carne em Portugal.....	7
1.1.5 Recomendações.....	8
1.2 METABOLISMO LIPÍDICO EM RUMINANTES.....	9
1.2.1 Processos digestivos no rúmen.....	9
1.2.2 Intestino delgado.....	12
1.2.3 Transporte de lípidos.....	13
1.3 DEPOSIÇÃO DOS ÁCIDOS GORDOS NO MÚSCULO.....	16
1.3.1 Composição em ácidos gordos da carne bovina.....	16
1.3.2 Fatores que influenciam a deposição no músculo.....	18
1.3.2.1 Fatores genéticos.....	19
1.3.2.2 Fatores ambientais.....	19
1.4 ERITRÓCITOS.....	22
1.4.1 Constituição lipídica dos eritrócitos.....	23

1.4.1 Turnover dos eritrócitos e seus fosfolípidos.....	25
2. OBJETIVOS.....	27
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1 DESENHO EXPERIMENTAL DO PROJETO.....	29
3.2 RECOLHA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	29
3.3 PROCEDIMENTOS.....	30
3.3.1 Extração dos lípidos totais	30
3.3.2 Separação/doseamento dos lípidos neutros e polares.....	30
3.3.3 Transesterificação combinada dos ácidos gordos totais do músculo e dos eritrócitos...30	
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31
4. RESULTADOS.....	33
4.1 CORRELAÇÕES ENTRE A COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GORDOS DOS ERITRÓCITOS E DO MÚSCULO.....	35
4.1.1 Correlações eritrócitos vs. lípidos neutros da carne.....	35
4.1.2 Correlações eritrócitos vs. lípidos polares da carne.....	37
4.1.3 Correlações eritrócitos vs. lípidos totais da carne.....	39
4.2 REGRESSÕES MÚLTIPLAS PARA PREVISÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS GORDOS NA CARNE ATRAVÉS DO PERFIL DOS ERITRÓCITOS.....	42
5. DISCUSSÃO.....	47
6. CONCLUSÃO.....	51
7. BIBLIOGRAFIA.....	53
ANEXOS.....	63
ANEXO 1 – PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS.....	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Biohidrogenação do ácido linoleico (esquerda) e do ácido linolénico (direita) (Adaptado de Harfoot e Hazlewood, 1997).	10
Figura 2 – Proporção de ácidos gordos saturados em relação ao teor de gordura (De Smet <i>et al</i> , 2004).	17
Figura 3 – Proporção de ácidos gordos polinsaturados em relação ao teor de gordura (De Smet <i>et al</i> , 2004).	18

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Composição Individual de cada classe de fosfolípidos de eritrócitos de bovinos (mole % total de fosfolípidos de eritrócitos) (Adaptado de Christie, 1981).....23

Tabela 2 – Proporção dos principais ácidos gordos na membrana dos eritrócitos em bovinos (mol/100 mol ácidos gordos) (Adaptado de Stangl *et al.*, 1999).....24

Tabela 3 – Proporção dos principais ácidos gordos nos fosfolípidos fosfatidiletanolamina e esfingomielina na membrana dos eritrócitos em bovinos (mol/100 mol ácidos gordos) (Adaptado de Stangl *et al.*, 1999).25

Tabela 4 - Delineamento experimental do ensaio em bovinos autóctones de raças Alentejana e Barrosã.29

Tabela 5 – Composição em ácidos gordos (% do total de AG) dos eritrócitos em comparação com a composição em ácidos gordos das frações lipídicas neutras e polares e dos lípidos totais da carne (*longissimus dorsi*) de bovino.33

Tabela 6 – Coeficientes de correlação entre as concentrações relativas de ácidos gordos selecionados dos eritrócitos com as dos lípidos neutros da carne.....36

Tabela 7 - Coeficientes de correlação entre as concentrações relativas de ácidos gordos selecionados dos eritrócitos com as dos lípidos polares da carne.....38

Tabela 8 - Coeficientes de correlação entre as concentrações relativas de ácidos gordos selecionados dos eritrócitos com as dos lípidos totais da carne.....40

Tabela 9 – Equações de regressão múltipla para previsão da composição em ácidos gordos dos lípidos totais da carne através da composição em ácidos gordos dos eritrócitos.....44

Tabela 6 – Equações de regressão múltipla para a previsão da composição em ácidos gordos totais da carne e frações polares e neutras da carne, quando se inclui ou não informação obtida com recurso à análise detalhada dos isómeros de CLA por HPLC.....45

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AG – Ácidos gordos

AGV - Ácidos gordos voláteis

ARA - Ácido araquidónico

CLA - Ácido linoleico conjugado

DCV – Doenças cardiovasculares

DOP - Denominação de origem protegida

DHA – Ácido docosahexaenóico

DMA - Dimetilacetais

DPA - Ácido docosapentanóico

EPA - Ácido eicosapentanoico

EPM – Erro padrão da média

GC – Cromatografia gasosa

GIM – Gordura intramuscular

HDL - Lipoproteínas de alta densidade

HPLC - Cromatografia líquida de alta pressão

IDL - Lipoproteínas de densidade intermediária

INE - Instituto nacional de estatística

LC PUFA - Ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa

LDL - Lipoproteína de baixa densidade

MS – Matéria seca

MUFA – Ácidos gordos monoinsaturados

PL - Fosfolípidos

PUFA - Ácidos gordos polinsaturados

SFA - Ácidos gordos saturados

TFA - Ácidos gordos *trans*

TAG - Triacilgliceróis

VLDL - Lipoproteínas de densidade muito baixa

INTRODUÇÃO

Atualmente, a composição em ácidos gordos dos lípidos da gordura da carne tem sido alvo de grande interesse, com particular importância tanto para a qualidade da carne como para a saúde humana. Decorrente da composição da carne ser rica em ácidos gordos (AG) saturados e *trans* e ser pobre em ácidos gordos polinsaturados (PUFA), tem sido associada ao desenvolvimento de várias doenças importantes como doenças vasculares, obesidade, diabetes tipo 2 e inúmeros cancros. Contudo, as gorduras de ruminantes são também a principal fonte natural de isómeros CLA, sendo os isómeros bioactivos (*cis-9,trans-11* e *trans-10,cis-12*) associados a propriedades potencialmente benéficas para a saúde humana.

Foram realizados vários estudos por forma a melhorar o valor nutritivo e a qualidade da carne de ruminantes, de modo a regular a deposição de gordura intramuscular (GIM) e a deposição de ácidos gordos. A deposição de AG está dependente de fatores genéticos e de fatores ambientes.

Este trabalho tem como objetivo estudar a hipótese de ser possível correlacionar os AG dos eritrócitos com os AG do músculo. As potenciais estratégias de produção de carne com um perfil de AG mais benéfico à saúde são difíceis de implementar na prática pois só é possível conhecer a constituição do músculo após a biópsia ou *post-mortem*. A análise sanguínea constituía assim um método mais rápido e pouco invasivo de controlo do perfil de AG ao longo do crescimento e acabamento do animal por forma a ir modulando o perfil muscular de AG.

A revisão bibliográfica deste trabalho é constituída por quatro capítulos. O primeiro capítulo descreve a composição da carne bovina, os efeitos dos AG na saúde, o consumo de carne em Portugal e as recomendações nutricionais. O segundo capítulo está descrito o metabolismo e o transporte lipídico. O terceiro capítulo aborda a deposição dos lípidos no músculo, assim como os fatores que a influenciam. O último capítulo descreve a constituição lipídica e o mecanismo de turnover dos eritrócitos bovinos.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. 1 COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GORDOS DA CARNE E EFEITOS NA SAÚDE DO CONSUMIDOR

1.1.1 Constituição da carne

A carne bovina é considerada um alimento de elevado valor nutricional, por possuir aminoácidos essenciais, lípidos, vitaminas e sais minerais adequados à alimentação humana.

A carne apresenta todas as vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K), as hidrossolúveis do complexo B (tiamina, riboflavina, nicotinamida, piridoxina, ácido pantoténico, ácido fólico, niacina, cobalamina e biotina) e, em menor quantidade, a vitamina C. É constituída também por todos os minerais, destacando-se o ferro, o fósforo, o potássio, o sódio, o magnésio e o zinco.

1.1.2 Ácidos gordos e efeitos na saúde

Na última década, houve por parte dos consumidores um interesse crescente em relação à composição dos lípidos da carne e dos produtos cárneos, como consequência da relação existente entre a dieta e a saúde, isto é, a composição das gorduras ingeridas está diretamente relacionada com o risco de doenças cardiovasculares (British Department of Health, 1994; Hu *et al.*, 2001). Frequentemente, devido a este facto, os consumidores têm associado a gordura a uma conotação negativa, considerando-a muitas vezes como insalubre/não saudável. Contudo, tanto a gordura como os ácidos gordos de cadeia longa, presentes no tecido adiposo e no músculo, contribuem significativamente para vários aspetos da qualidade da carne e são fundamentais no seu valor nutritivo (Wood *et al.*, 2008).

Inicialmente, foi recomendada uma redução total da gordura ingerida a fim de reduzir os potenciais efeitos adversos desta na obesidade e nas doenças cardiovasculares (Webb & O'Neill, 2008). Recentemente, as orientações nutricionais estão a mudar no sentido da qualidade em vez da quantidade da gordura ingerida. Isto significa que as recomendações não se referem apenas às quantidades de gordura mas também à composição de ácidos gordos dos alimentos. Especificando, é recomendado uma menor ingestão de SFA e TFA bem como uma maior ingestão de PUFA, em especial os PUFA ómega 3 (Griffin, 2008; Sierra *et al.*, 2008).

O ácido palmítico (16:0) e o ácido esteárico (18:0) são os principais ácidos gordos saturados (SFA), o ácido oleico (18:1 *cis*-9) é o AG monoinsaturado (MUFA) predominante (Scollan *et al.*, 2006; Sinclair, 2007) e os ácidos 18:2 n-6, 18:3 n-3 e araquidónico (20:4 n-6; ARA) são os predominantes os AG polinsaturados (PUFA) em carnes provenientes de ruminantes (Raes *et al.*, 2004).

Os ácidos gordos saturados favorecem o aumento de todas as lipoproteínas, a diminuição do tamanho dos quilomicras, a indução de trocas na composição de VLDL e HDL, a diminuição da síntese hepática e da atividade do recetor - LDL. Os SFA apresentam diferentes respostas colesterolémicas. O ácido láurico (dodecanóico, 12:0), o ácido mirístico (tetradecanóico, 14:0) e o ácido palmítico (hexadecanóico, 16:0) são hipercolesterolémicos (Givens, 2005), enquanto o ácido esteárico (18:0) e os SFA de cadeia curta (4:0 e 6:0) são considerados neutros neste aspeto (Givens, 2005; Lee *et al.*, 2006). Dentro dos SFA hipercolesterolémicos, o ácido 14:0 possui um efeito superior relativamente aos ácidos 12:0 e 16:0 no aumento do colesterol total e no colesterol LDL (Kris-Etherton and Yu, 1997).

Alguns ácidos gordos insaturados têm recebido particular atenção, nomeadamente os que contêm uma ou duas ligações duplas na configuração *trans* em vez da configuração *cis*.

Os ácidos gordos *trans* encontram-se em alguns alimentos, especialmente nos derivados de ruminantes, resultantes da biohidrogenação ruminal dos ácidos gordos insaturados (Fritsche & Steinhart, 1998a), representando frequentemente 2 – 4% do total de AG da carne de ruminantes (Valsta *et al.*, 2005).

Os isómeros 18:1 *trans* constituem cerca de 80% do total TFA na carne e produtos cárneos, sendo o 18:1 *trans*-11 o principal isómero 18:1 *trans* (cerca 60% do total de isómeros 18:1 *trans*) (Prates and Bessa, 2009).

Os estudos demonstram que ácidos gordos *trans* podem contribuir para o aumento de LDL e da lipoproteína (a), além de reduzir os níveis de HDL. Os isómeros *trans* também impedem a ação de enzimas de dessaturação dos ácidos gordos essenciais (Δ 5- e Δ 6-dessaturase), inibindo a biossíntese de importantes ácidos gordos, como o ácido araquidónico e o ácido docosahexaenóico (DHA). (Costa *et al.*, 2006)

Os efeitos dos SFA e dos TFA sobre a LDL são similares. No entanto, segundo Ross *et al.* (2002), os TFA promovem uma redução nos níveis de HDL, diferentemente dos SFA. Além disso, segundo este autor, estes isómeros promovem a inibição da atividade da paraoxonase,

uma enzima que está envolvida na prevenção da oxidação lipídica e, conseqüentemente, do risco de doenças cardiovasculares (DCV).

O mecanismo que explica os efeitos dos isômeros *trans* sobre as doenças cardiovasculares ainda não é conhecido, porém sabe-se que eles estão relacionados com a redução nas concentrações de HDL.

Os PUFA, e principalmente os MUFA, estão relacionados com a redução dos níveis de colesterol LDL, aumento moderado de colesterol HDL, redução da pressão arterial, tendo como resultado a redução do risco de doenças cardíacas.

O ácido gordo, 18:1 *cis*-9 (MUFA) é conhecido por ter propriedades hipocolesterolêmicas, ou seja, reduz os níveis de colesterol LDL e aumenta as concentrações de lipoproteínas de alta densidade (HDL) no sangue, o que conduz a um menor risco de problemas coronários (Katan *et al.*, 1994).

Os ácidos gordos polinsaturados das famílias ômega-3 e ômega-6, aos quais estão associados inúmeros efeitos benéficos, são indispensáveis à vida humana e não podem ser sintetizados pelo organismo. São chamados de ácidos gordos essenciais e devem ser ingeridos obrigatoriamente na alimentação.

A família ômega 3 (PUFA n-3) compreende o ácido gordo essencial alfa-linolênico (18:3, n-3), do qual, por alongamento e dessaturação, são gerados os ácidos eicosapentanoico (EPA - 20:5 n-3) e docosahexaenóico (DHA - 22:6 n-3) (Belda and Pourchet-Campos, 1991).

Os PUFA n-3 favorecem a diminuição do colesterol no sangue (elevação do colesterol HDL), têm propriedades anti-trombótica e anti-aterogénica. Têm um efeito protetor no aparecimento de perturbações do ritmo cardíaco e das doenças cardiovasculares de uma forma geral. Epidemiologicamente, apresentam um efeito benéfico na prevenção de vários tipos de cancro (Curi *et al.*, 2002).

A família ômega-6 (PUFA n-6) compreende o ácido gordo essencial linoleico, que pode originar o ácido araquidónico, também por alongamento e dessaturação. O ácido araquidónico passa a ser essencial se o seu precursor, o ácido linoleico, não estiver presente na alimentação (Champe & Harvey, 1997).

Os ácidos gordos ômega 6 têm como função a proteção contra as doenças cardiovasculares, com uma diminuição do colesterol sanguíneo total. Exercem um importante papel fisiológico

como potentes mediadores da inflamação e um efeito benéfico sobre o sistema imune (Pompéia *et al.*, 1999).

Ambas as famílias de PUFA apresentam efeitos hipocolesterolémicos e reduzem os níveis de LDL, através de modificação na composição das membranas celulares e das lipoproteínas, além de induzir o aumento das excreções biliar e fecal do colesterol, reduzindo a síntese do VLDL no fígado (British Nutrition Foundations, 1994). São os precursores de um conjunto de substâncias com atividades fisiológicas e farmacológicas denominadas eicosanóides, que abrangem as tromboxanas, prostaglandinas (possuem efeitos hipotensores), prostaciclina (inibem a agregação plaquetária e aumenta o HDL) e leucotrienos. O equilíbrio entre a produção de prostaglandinas e tromboxanos inibe o aparecimento de doenças cardiovasculares (Turatt *et al.*, 2002).

Resultados de estudos epidemiológicos e ensaios clínicos controlados têm mostrado que a substituição de gordura saturada (SFA) por gordura insaturada (incluindo *cis* MUFA e PUFA) é melhor sucedida na redução do risco de doença coronária do que reduzir o consumo de gordura total. Estes resultados são a base para importantes mudanças nas recomendações no consumo de gordura (Hu *et al.*, 2001; Sacks e Katan, 2002).

As pesquisas nutricionais têm-se concentrado nos benefícios de EPA e DHA na saúde, que são sintetizados endogenamente no corpo humano, mas em baixos níveis considerados inadequados para atender às necessidades dos PUFA LC n-3 (Lourenço *et al.*, 2008). O consumo e / ou suplementação dietética de EPA e DHA pode reduzir o risco de doença cardiovascular, bem como algumas doenças inflamatórias e neurológicas (Rymer & Givens, 2005; Scollan *et al.*, 2006; Griffin, 2008).

Os EPA e DHA demonstram conter efeitos anti-aterogénico, anti-trombótico e anti-inflamatório (Givens *et al.*, 2006), e também por ter um papel importante na redução do cancro, obesidade e diabetes tipo 2 (WHO, 2003).

O colesterol é também um importante componente em alimentos de origem animal, especialmente na carne, já que o colesterol é um constituinte essencial (esteróis) das células animais, localizadas principalmente em componentes da membrana (Chizzolini *et al.*, 1999) e serve como precursor de hormonas esteroides incluindo estrogénio, progesterona, aldosterona e sais biliares.

1.1.3 Ácido linoleico conjugado

Como referido anteriormente, a carne de ruminantes contém elevados teores de SFA e TFA, que contribuem para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Mas a verdade é que são também uma fonte natural dos isómeros de CLA (Ácido linoleico conjugado), pelo facto destes serem intermediários da biohidrogenação ruminal do ácido linoleico (Harfoot e Hazlewood, 1997). A carne de ruminantes contém assim teores superiores de CLA comparativamente à carne de animais não ruminantes.

O CLA consiste num grupo de isómeros posicionais e geométricos do ácido *cis-9, cis-12* octadecadienóico, de nome comum ácido linoleico, e o termo conjugado refere-se à existência de duplas ligações (insaturação) com um carbono simples entre elas, em vez de uma ligação comum de metileno (saturação).

O CLA tem sido associado a uma multiplicidade de efeitos benéficos na saúde, incluindo inibição carcinogénica, redução da taxa de deposição, modulação da atividade imunitária, redução dos lípidos séricos, efeito anti-diabético (redução da hiperglicémia e diabetes (tipo II)) e anti-aterogénico (Bauman *et al.*, 1999; Belury, 2003; Kritchevsky, 2003; Pariza, Park, & Cook, 2001).

Devido à configuração (*cis* ou *trans*) e ao local de ocorrência das duplas ligações, já foram identificados vários possíveis isómeros de CLA. Entre os isómeros, o 18:2 *cis-9,trans-11* é o que predomina na gordura dos ruminantes (Bauman and Griinari, 2001), constituindo cerca de 80% do total CLA (Schimd *et al.*, 2006) e apresenta maior potencial anti-cancerígenogénico (Parodi, 1999). É associado à inibição do crescimento de tumores, à redução de doenças cardiovasculares e ao estímulo do sistema imunitário.

O isómero 18:2 *trans-10,cis-12* possui um efeito no metabolismo dos lípidos, podendo alterar a composição corporal de animais em crescimento (Park *et al.* 1999). Estão associados à ação sobre determinadas enzimas responsáveis pela síntese de gordura na glândula mamária, reduzindo assim a produção e a concentração no leite.

1.1.4 Consumo de carne em Portugal

Em Portugal, o consumo *per capita* de carnes e miudezas em 2007 foi de 108,9 kg e em 2011 de 107,1, tendo em 2009 alcançado o valor de 113,4 kg.

No que respeita ao consumo *per capita* de carne bovina em Portugal, em 2007 foi de 18,6 kg, tendo em 2008 o valor de 19,5 kg. No último ano apresenta o valor mais baixo desde 2007, de 17,1 kg (INE, 2012).

1.1.5 Recomendações

Decorrente da importância dos ácidos gordos na salubridade e qualidade da carne, em particular na de ruminantes, a Organização Mundial de Saúde desenvolveu diretrizes específicas no que respeita ao consumo de gordura. Assim, a proporção de gordura total, de ácidos gordos, de ácidos gordos *trans* e de colesterol têm sido consideradas metas nutricionais importantes para a saúde pública (Kraft *et al.*, 2008).

Assim, a ingestão de gorduras deve ser idealmente inferiores a 30-35% da energia total da dieta, a ingestão de SFA não deve ser superior a 10% da energia total, a ingestão de TFA deve ser menos de 1-2% da energia total e a ingestão de MUFA deve ser cerca de 10% da energia total.

Em relação aos PUFA, 4-10% da ingestão calórica deve ser de PUFA n-6 e 0,5-2% de PUFA n-3, em especial de ácidos eicosapentanoico (EPA, ácido eicosapentanoico n-3 *cis-5,cis-8,cis-11,cis-14,cis-17*) e docosahexaenóico 20:5 (DHA, ácido docosahexaenóico, 22:6 n-3 *cis-4,cis-7, cis-10,cis-13,cis-16,cis-19*).

Para além da redução do teor de ácidos gordos na dieta, as orientações nutricionais recomendam também limitar a ingestão de colesterol, ao máximo de 300 mg / dia (WHO, 2003), a fim de reduzir o risco associado à obesidade e hipercolesterolemia (Ganji *et al.*, 2003; Valsta *et al.*, 2005; Jiménez-Colmenero, 2007).

1.2 METABOLISMO LIPÍDICO EM RUMINANTES

A composição dos ácidos gordos dos lípidos da carne e do leite de animais ruminantes difere significativamente da de animais não ruminantes. Este facto pode ser explicado quer pela natureza dos lípidos ingeridos, quer pela diferença na digestão dos lípidos.

Os ruminantes apresentam como principal característica digestiva o facto de apresentarem um estômago formado por quatro compartimentos distintos (rúmen, retículo, omaso e abomaso). Nos 3 primeiros compartimentos é realizada a digestão fermentativa, que precede a digestão enzimática iniciada no abomaso. Esta estrutura do sistema digestivo capacita os ruminantes de aproveitar com grande eficiência os alimentos que possuam na sua constituição uma grande percentagem de fibra.

Os lípidos da dieta dos ruminantes são derivados de forragens e de alimentos compostos constituídos por cereais, bagaços de oleaginosas e outras matérias-primas, sendo designados vulgarmente por “concentrados”. Por vezes podem ser utilizados na dieta fontes lipídicas como óleos vegetais, sabões cálcicos, gorduras hidrogenadas ou de origem animal.

Os lípidos de forragem são constituídos principalmente por galactolípidos e outros glicolípidos ricos em ácido linolénico (18:3). Pelo contrário, os lípidos provenientes de cereais e oleaginosas são constituídos principalmente por triacilgliceróis (Harfoot and Hazelwood, 1997), ricos em ácido linoleico (18:2).

1.2.1 Processos digestivos no rúmen

O rúmen desempenha um papel essencial no metabolismo dos lípidos devido aos processos microbianos que nele ocorrem, nomeadamente a lipólise, a biohidrogenação e a síntese *de novo*.

No rúmen, os lípidos da dieta são extensamente hidrolisados e os ácidos gordos insaturados libertados são transformados em duas etapas (Dawson & Kemp, 1970), uma inicial, denominada de isomerização, seguida da hidrogenação.

A primeira etapa da transformação dos lípidos, denomina-se como lipólise. Este processo é caracterizado pela hidrólise das ligações éster pelas enzimas lipolíticas microbianas, localizadas na superfície dos microrganismos, ficando os AG na forma não esterificada (“livre”), condição necessária para que ocorra a hidrogenação (Palmquist & Mattos, 2006). Os

principais produtos resultantes são os ácidos gordos livres e o glicerol, formando-se também em menor número galactose.

O glicerol e galactose resultantes são então metabolizados e convertidos em ácidos gordos voláteis (AGV), que posteriormente são absorvidos através da parede ruminal, reticular ou omasal.

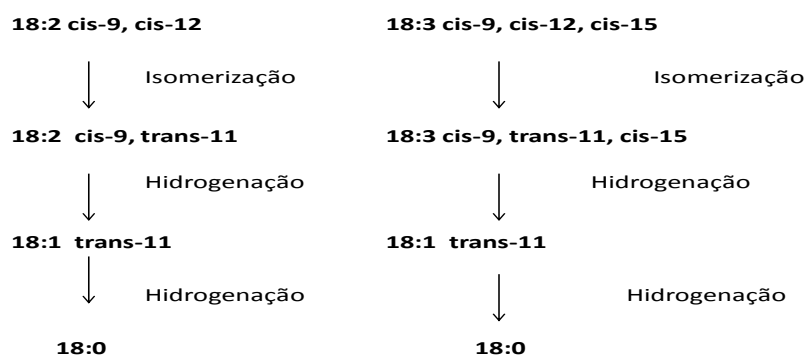
A extensão da hidrólise é frequentemente elevada (> 85%) (Bauchart *et al.*, 1990a). Contudo, foram identificados vários fatores que diminuem a extensão da hidrólise, como o nível de lípidos na dieta (Beam *et al.*, 2000) e o pH baixo (Van Nevel and Demeyer, 1996).

Após serem hidrolisados, os ácidos gordos insaturados são submetidos ao processo de biohidrogenação que inclui uma etapa inicial de isomerização, seguido de etapas de hidrogenação.

A isomerização consiste em modificações da conformação geométrica (passando de *cis* para *trans*) e posicionais de algumas duplas ligações. Após este processo, procede-se à redução de duplas ligações, aumentando o grau de saturação dos ácidos gordos. Os fatores que afetem a hidrólise também influenciam a biohidrogenação, já que a presença do grupo carboxílico livre é indispensável para que esta ocorra.

A isomerização do ácido linoleico (18:2 *cis-9,cis-12*) e linolénico (18:3 *cis-9,cis-12,cis-15*) é catalisada pela enzima linoleato isomerase, convertendo-os em 18:2 *cis-9,trans-11* (CLA) e 18:3 *cis9,trans11,cis-15*, respetivamente. Posteriormente, dá-se a redução destes intermediários até se formar o ácido vacénico (18:1 *trans-11*) (Figura 1). Seguidamente ocorre a redução do ácido vacénico a ácido esteárico (18:0) que se acumula no rúmen, sendo o ácido mais abundante aquando da absorção no intestino delgado (Keeney, 1970). Contudo, a biohidrogenação ruminal é frequentemente incompleta, originando uma grande diversidade de intermediários, dos quais se destaca o ácido vacénico, que ficam também disponíveis para a absorção.

Figura 1 - Biohidrogenação do ácido linoleico (esquerda) e do ácido linolénico (direita) (Adaptado de Harfoot e Hazlewood, 1997).



A produção de CLA está desta forma relacionada com a taxa de biohidrogenação e esta encontra-se dependente do tempo de retenção dos alimentos no rúmen e da qualidade da fibra (Stockdale *et al.*, 2003).

O papel da biohidrogenação no ecossistema microbiano ruminal não é ainda bem compreendido, mas a teoria mais aceite admite que seja uma estratégia de desintoxicação para prevenir os efeitos tóxicos dos AG insaturados sobre as bactérias ruminais (Harfoot e Hazelwood, 1997, Maia *et al.* 2007).

A biohidrogenação ruminal está dependente do tipo e quantidade de ácidos gordos polinsaturados ingeridos, da dieta base e pH ruminal. As taxas de lipólise e biohidrogenação são menores em situações de elevada concentração de hidratos de carbono não estruturais na dieta decorrente da queda de pH (Van Soest and Demeyer, 1996a), resultando numa maior “fuga” de ácidos gordos insaturados. O baixo pH do rúmen pode afetar a etapa final da biohidrogenação, onde o 18:1 *trans* é convertido a ácido esteárico (Demeyer e Doreau, 1999). Por outro lado, a elevada concentração de hidratos de carbono não estruturais na dieta induz uma alteração das vias de biohidrogenação em que o principal intermediário deixa de ser o 18:1 *trans-11* e passa a ser o 18:1 *trans-10* (trans-10 shift).

A bactéria *Butyrivibrio fibrisolvens* (Kepler and Tove, 1967) é a principal responsável pela biohidrogenação que ocorre no rúmen.

Os microrganismos do rúmen, além de modificarem o perfil de ácidos gordos da dieta, também sintetizam (síntese *de novo*) uma série de ácidos gordos saturados de cadeia impar (contendo 15 a 17 átomos de carbono) e/ou ramificada (que são característicos das gorduras de ruminantes). A síntese *de novo* de AG ocorre no citosol e é processo cíclico no qual são adicionadas consecutivamente unidades acetil (2-carbonos) a uma molécula inicial,

normalmente o acetil-CoA para os ácidos gordos de cadeia par, e o propinil-CoA para os de cadeia ímpar, e iso-butilil ou iso-valeril-CoA para os de cadeia ramificada.

A quantidade de ácidos gordos sintetizados pelas bactérias vai depender da quantidade lipídios fornecida pela dieta, diminuindo à medida que aumenta a sua quantidade. Quando a disponibilidade de gordura na dieta é grande, os microrganismos incorporam os ácidos gordos nas suas células, inibindo a síntese de novo. Assim, o fornecimento de gordura suplementar na dieta, reduz a síntese microbiana (Doreau and Ferlay, 1994).

1.2.2 Intestino delgado

A maioria dos ácidos gordos, quando chegam ao intestino delgado, encontram-se na forma não esterificada (ácidos gordos livres), não iónica e insolúvel e ligados à fase sólida do digesta. Os restantes componentes lipídicos são os fosfolípidos microbianos e pequenas quantidades de triacilgliceróis e glicolípidos de matérias-primas residuais, que são hidrolisados por lipases intestinais e pancreáticas (Doreau and Ferlay, 1994).

Através do ducto biliar entram no duodeno o suco pancreático e a bÍlis que são essenciais aos processos de digestão e absorção dos lípidos. São transferidos da fase insolúvel para a fase micelar através da ação da bÍlis, de modo a permitir a posterior absorção, nomeadamente no jejuno. Como nesta porção do intestino delgado o pH é baixo, a ação da bÍlis é fundamental devido à fraca atividade das lipases pancreáticas.

Os lípidos em suspensão no fluido luminal são emulsionados e solubilizados pelas micelas dos sais biliares. A emulsificação decorre da ação detergente dos sais que provocam a diminuição da tensão superficial das gotas de gorduras. Estas, posteriormente, são clivadas de modo a formar gotas de menores dimensões, favorecendo deste modo o aumento da área superficial dos lípidos expostos à ação das enzimas hidrolíticas e facilitando assim a digestão.

As micelas dos sais biliares removem e incorporam os lípidos das gotículas de gordura, formando as micelas mistas. Os produtos da hidrólise lipídica são absorvidos nas suas formas livres. As micelas entram em contacto com as microvilosidades das células da mucosa intestinal onde ocorre a sua rotura, de modo a permitir que os ácidos gordos livres sejam absorvidos.

Nas células da mucosa intestinal, o destino dos AG absorvidos é determinado pelo comprimento das cadeias carbonadas. Os ácidos gordos que têm um comprimento de cadeia

de menos de 12 átomos de carbono entram diretamente no sistema pelo portal venoso e são transportados para o fígado. Os ácidos gordos com 12 ou mais carbonos são re-esterificados no enterócito e entram na circulação pela via linfática como quilomícras.

Os ácidos gordos livres absorvidos são re-esterificados com o glicerol de origem endógena, nos retículos endoplasmáticos rugoso e liso e, após a formação da apoproteína respetiva no complexo de golgi, vão formar a lipoproteína para ser transportada: quilomícras ou VLDL.

1.2.3 Transporte de lípidos

Devido à insolubilidade em meio aquoso, os lípidos são transportados nos fluidos dos sistemas vasculares (plasma e linfa) de duas maneiras: 1) os triacilgliceróis, o colesterol e os seus ésteres são incorporados em lipoproteínas plasmáticas e 2) os ácidos gordos livres (não-esterificados) ligam-se à albumina sérica.

As lipoproteínas são constituídas por um núcleo central hidrofóbico, onde se localizam os triacilgliceróis e os ésteres de colesterol. Este núcleo é rodeado por lípidos anfipáticos, como os fosfolípidos e colesterol livre e, na parte mais externa, por proteínas (apoproteínas). Estas proteínas exercem duas funções: solubilizar os lípidos hidrófobos e servir de sinal para as células-alvo, que possuem recetores específicos.

As lipoproteínas diferem quanto à proporção de lípidos e proteínas, o que é refletido na sua densidade: quanto maior o conteúdo lipídico, menor a densidade. Esta característica é normalmente utilizada para classificar os diferentes tipos de lipoproteínas.

As quilomícras são lipoproteínas de densidade muito baixa ($d < 0,95 \text{ g/cm}^3$), porque são constituídas por cerca de 90% de triacilgliceróis. São sintetizadas exclusivamente nos enterócitos e transportam triacilgliceróis da dieta aos tecidos muscular e adiposo e mamário, e o colesterol da dieta ao fígado.

Na forma de quilomícra nascente encontram-se no ducto linfático com a apoproteína B-48 (apo B-48). Sob a forma de quilomícra propriamente dita, recebem as apoproteínas das HDL e transferem os triacilgliceróis às células. Na forma de quilomícra remanescente, os teores de triacilgliceróis são reduzidos, devolvem as apoproteínas às HDL e passam a ser retiradas do sangue pelas células hepáticas.

As lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), são sintetizadas sobretudo no fígado (em jejum), mas evidências existem para sua síntese e secreção no intestino de ruminantes

(Bauchart, 1993). São constituídas principalmente por triacilgliceróis, pequenas quantidades de colesterol e fosfolípidos (Havel, 1985).

Representam uma forma alternativa de transporte de triacilgliceróis oriundos da dieta para os tecidos, através de vasos sanguíneos e linfáticos. A principal função das VLDLs é transportar triacilgliceróis e colesterol endógenos (sintetizados no fígado) para os tecidos. Após libertar os seus triacilgliceróis, surgem na circulação como lipoproteínas de densidade intermediária (IDL). Essas partículas têm dois destinos: metade delas é captada pelo fígado e outra metade é convertida à lipoproteína de baixa densidade (LDL). As LDL são ricas em ésteres de colesterol, e são a principal forma de distribuição de colesterol aos vários tecidos, onde é necessário para síntese de membranas e hormonas. Na sua forma nascente deixam o fígado com a apoproteína B-100 recebendo das HDL outras apoproteínas. Na forma de VLDL madura transferem os triacilgliceróis às células do organismo. Quando os teores de triacilgliceróis são muito reduzidos, devolvem as apos (apoproteínas) às HDL-3 e passam a ser chamadas de VLDL remanescente ou LDL, voltando a ser metabolizadas pelo fígado.

As LDL são captadas pelas células mediante recetores de membrana específicos para a apo B-100, que a célula produz à medida da necessidade de incorporar colesterol. A falta desta lipoproteína é responsável pela doença hipercolesterolemia familiar (elevados níveis de colesterol no sangue), sendo um dos fatores envolvidos no desenvolvimento da aterosclerose, devido à acumulação de colesterol na corrente sanguínea. As LDL associam-se a um maior risco de doença coronária (consiste no desenvolvimento de placas no interior das artérias coronárias. Estas placas são formadas por depósitos de gordura e outras substâncias e chamam-se placas de aterosclerose).

As lipoproteínas de alta densidade (HDL) desempenham essencialmente a função oposta das LDL, removem o colesterol dos tecidos. Capta o colesterol libertado no plasma pela morte celular e a partir da remodelação das membranas. O colesterol em excesso nos tecidos periféricos, armazenados na sua forma esterificada, pode ser transportado pelas HDLs diretamente para o fígado (transporte reverso do colesterol), onde é libertado na forma de ácidos biliares, secretados no intestino delgado. Isto conduz a uma diminuição da quantidade de colesterol no sangue ou presente em células, diminuindo assim o risco do aparecimento de doenças que a hipercolesterolemia provoca, como doenças coronárias, opacidades córneas e xantomas planares. Estas lipoproteínas são sintetizadas no fígado e no intestino, e cerca de 50% do seu peso é devido a apoproteínas, das quais as apo A-I e A-II são predominantes.

Estudos sugerem que estas lipoproteínas, provavelmente, são as mais protetoras contra o desenvolvimento da doença coronária aterosclerótica.

Finalmente, após os processos de absorção, transporte intracelular e plasmático e síntese, os AG são utilizados como fonte de energia, na estrutura de membranas e, no caso dos AG essenciais, como precursores de eicosanóides. Os AG também serão importantes em vários sistemas fisiológicos, e como mediadores da resposta imune e inflamatória.

A fonte primária para a síntese dos ácidos gordos é o acetato proveniente do rúmen, sendo que o tecido adiposo e a glândula mamária (tecido alveolar) constituem-se como os principais sítios para a sua síntese.

1.3 DEPOSIÇÃO DOS ÁCIDOS GORDOS NO MÚSCULO

1.3.1 Composição em ácidos gordos da carne bovina

O teor em lípidos (gordura intramuscular) e a composição de ácidos gordos da carne depende de fatores genéticos (músculo, idade ou peso vivo, sexo e raça) e de fatores ambientais (alojamento, clima, estação do ano e bem-estar animal e principalmente da dieta) (Raes *et al.*, 2001; Aldai *et al.*, 2006b; Okeudo & Moss, 2007). A gordura intramuscular (GIM) é composta por aproximadamente vinte ácidos gordos, onde seis destes ácidos correspondem a cerca de 92% do total (oleico, palmítico, esteárico, linoleico, palmitoleico e mirístico). A composição de ácidos gordos da gordura intramuscular da carne bovina é cerca de 44-55% de saturados, 45-50% de monoinsaturados e relativamente menores quantidade de ácidos gordos polinsaturados até 5% (Enser *et al.*, 1996; Scollan *et al.*, 2006). Os TFA ocorrem naturalmente em pequena quantidade, usualmente 2-4% do total de ácidos gordos em carne de ruminantes, mas em animais monogástricos os valores são muito inferiores (Fritsche & Steinhart, 1998a; Valsta *et al.*, 2005). O principal 18:1 *trans* em alimentos derivados de ruminantes é o 18:1 *trans-11*, que prevalece com cerca de 60% do total 18:1 *trans* (Valsta *et al.*, 2005; Prates & Bessa, 2009).

A composição de ácidos gordos do músculo é fortemente influenciada pelo teor de gordura intramuscular, que é muito variável com a raça do animal, a idade, o sexo, tipo de músculo e condição corporal (De Smet *et al.*, 2004). Os lípidos do músculo são compostos por lípidos

polares, principalmente fosfolípidos localizados nas membranas celulares, e por lípidos neutros consistindo principalmente em TAG em adipócitos que são localizados nos espaços inter-fibrilares e na área interfascicular. Uma pequena quantidade de TAG está também presente como gotículas citosólicas nas fibras do músculo (Gandemer, 1999).

O teor de fosfolípidos do músculo é relativamente constante e independente do teor de gordura total (Wood *et al.*, 2008), e varia entre 0,2 e 1 g/100 g do peso do músculo (De Smet *et al.*, 2004, Raes *et al.*, 2004), como consequência do seu importante papel como componente das membranas celulares. A composição em ácidos gordos dos fosfolípidos está sujeita a um rigoroso controlo metabólico de modo a manter as propriedades da membrana (Raes *et al.*, 2004). Os fosfolípidos são caracterizados pelo elevado teor em PUFA (20-50 g/100 g do total de ácidos gordos), principalmente representados por ácidos gordos de cadeia longa com 18, 20 e 22 átomos de carbono e com 2 a 6 ligações duplas (principalmente 18:2 n-6 e 18:3 n-3, bem como os seus derivados de cadeia longa, como ARA, EPA, DPA e DHA (Raes *et al.*, 2004).

As variações da gordura intramuscular são explicadas maioritariamente por maior ou menor deposição de TAG, onde são depositados preferencialmente os SFA, MUFA e ácidos gordos de origem ruminal, incluindo os CLA. O teor em TAG varia geralmente entre 0,2 e 5 g/100 g do peso do músculo (De Smet *et al.*, 2004, Raes *et al.*, 2004).

Os SFA aumentam, e os PUFA diminuem com o aumento da GIM (Fig. 2 e 3). O 18:2 n-6 e os PUFA de cadeia longa (C > 18) são depositados preferencialmente nos fosfolípidos. O 18:3 n-3, manifesta semelhante comportamento apesar de ser, distribuído de forma mais equivalente em ambas frações de lípidos do que os anteriores (De Smet *et al.*, 2004, Wood *et al.*, 2008). Os ácidos gordos provenientes da biohidrogenação ruminal, que incluem isómeros 18:1 *trans*, 18:2 *trans*, incluindo os CLA, são depositados preferencialmente nos lípidos neutros (Jerónimo *et al.*, 2011).

De Smet *et al.* (2004) (Figura 2 e 3) relataram que a relação PUFA/SFA diminuiu à medida que houve um aumento da percentagem de gordura intramuscular até um ponto de estabilização: raças mais gordas a proporção pode reduzir até 0,05, enquanto em raças mais magras pode aumentar até valores maiores que 0,5 (animais de musculatura dupla). Outros autores concluíram que a relação entre os AG polinsaturados e saturados em carnes de bovinos e ovinos variou entre 0,11 e 0,15; valores estes abaixo da recomendação para humanos, que deve ser acima de 0,4.

Figura 2 – Proporção de ácidos gordos saturados em relação ao teor de gordura (De Smet *et al*, 2004).

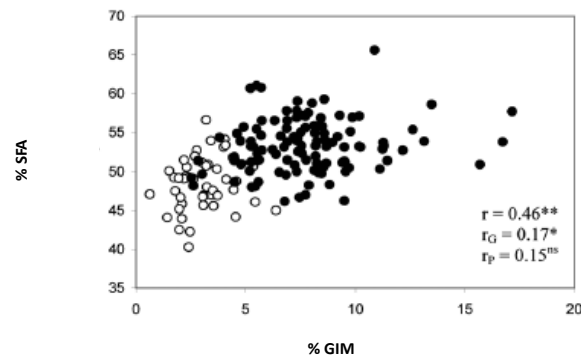
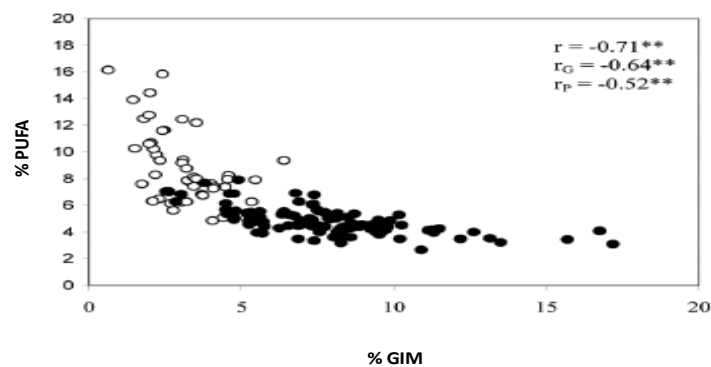


Figura 3 – Proporção de ácidos gordos polinsaturados em relação ao teor de gordura (De Smet *et al*, 2004).



Os diversos tipos de músculos diferem na composição de gordura com base na função e na localização destes no corpo, diferindo assim a composição de ácidos gordos.

Os músculos vermelhos oxidativos contêm teores superiores de fosfolípidos, com maiores teores de fosfatidiletanolamina e cardiolipina, em relação aos músculos brancos, glicolíticos. Estas diferenças podem ser explicadas por duas razões: por um lado devido ao elevado teor em organelos, particularmente mitocôndrias, do músculo vermelho e por outro ao tipo de fosfolípidos da composição da membrana mitocondrial em relação ao tipo de fosfolípidos de outras membranas (Raes *et al.*, 2004).

O músculo *longissimus dorsi*, é do tipo muscular esquelético, é o mais estudado e por isso muito utilizado como base comparação entre trabalhos de vários autores.

1.3.2 Fatores que influenciam a deposição no músculo

Os ácidos gordos incorporados no músculo diferem dos ácidos gordos ingeridos através da alimentação devido à atividade microbiana existente no rúmen, não só pelos processos digestivos inerentes como pela própria síntese realizada pelos microrganismos. Por outro lado, uma fração variável dos ácidos gordos incorporados no músculo, não é proveniente diretamente da dieta, mas sim sintetizados pelo animal (síntese *de novo*).

1.3.2.1 Fatores genéticos

Com o aumento da idade e do peso os animais tendem a depositar maior quantidade de gordura, o que conduz a um aumento na SFA e a uma diminuição nos níveis de PUFA (Nürnberg *et al.*, 1998; Rhee, 2000). O sexo e as hormonas sexuais podem estar ligados ao nível de gordura, na medida em que os machos possuem menor quantidade de gordura intramuscular, com maiores quantidades de PUFA e menores quantidades de SFA e de MUFA que as fêmeas (Nürnberg *et al.*, 1998). A castração também influencia a composição de ácidos gordos intramuscular (menos PUFA e mais SFA) resultando numa situação intermédia entre machos e fêmeas (Monteiro *et al.*, 2006).

O efeito do genótipo/raça na composição ácidos gordos está muito associado a diferenças de maturidade biológica, e assim confundido com os efeitos da idade e peso. Contudo, diferenças entre grupos genéticos (*Bos taurus* vs *Bos indicus*) têm sido relatadas (Bressan *et al.*, 2011), em que o sistema de acabamento apresenta maior impacto na deposição de GIM, concentração total de SFA e PUFA e no respetivo rácio.

É também notável a raça Wyau que apresenta deposição extrema de GIM e de ácido oleico (Smith *et al.*, 2006).

Os efeitos genéticos são muito menores dos que obtidos por fatores alimentares (De Smet *et al.*, 2004).

1.3.2.2 Fatores Ambientais

Com o aumento da idade e do peso os animais tendem a depositar maior quantidade de gordura, o que conduz a um aumento dos teores SFA e a uma diminuição dos teores de PUFA (Nürnberg *et al.*, 1998; Rhee, 2000). O sexo e as hormonas sexuais podem estar ligados ao nível de gordura, na medida em que os machos possuem menor quantidade de gordura intramuscular, com maiores quantidades de PUFA e menores quantidades de SFA e de MUFA que as fêmeas (Nürnberg *et al.*, 1998). A castração também influencia a composição de ácidos gordos intramuscular (menos PUFA e mais SFA) resultando numa situação intermédia entre machos e fêmeas (Monteiro *et al.*, 2006).

O efeito do genótipo/raça na composição ácidos gordos está muito associado a diferenças de maturidade biológica, e assim confundido com os efeitos da idade e peso. Contudo, diferenças entre grupos genéticos (*Bos taurus* vs *Bos indicus*) têm sido relatadas (Bressan *et al.*, 2011), em que o sistema de acabamento apresenta maior impacto na deposição de GIM, concentração total de SFA e PUFA e no respetivo rácio.

É também notável a raça Wyau que apresenta deposição extrema de GIM e de ácido oleico (Smith *et al.*, 2006).

Os efeitos genéticos são muito menores dos que obtidos por fatores alimentares (De Smet *et al.*, 2004).

1.3.2.2 Fatores Ambientais

A dieta dos ruminantes determina em grande parte a qualidade da carne, a composição de ácidos gordos e concentração de vários nutrientes. O sistema de alimentação, quer com concentrado, quer com pastagem ou ambos, tem assim uma grande influência sobre o valor nutricional dos lípidos da carne.

Os ruminantes consomem uma dieta com baixo teor em gorduras, mas com elevados teores em PUFA, de erva fresca e de erva conservada. No entanto, uma elevada proporção de PUFA sofre biohidrogenação microbiana, conduzindo a que os SFA sejam predominantemente absorvidos no intestino e depositados nos tecidos. Alterações na disponibilidade de substrato (PUFA) e na extensão da biohidrogenação ruminal afetam o fluxo de intermediários (isómeros 18:1 *trans*, 18:1 *cis*, e 18:2 conjugados e não conjugados) e produtos finais para

duodeno e disponibilizados para a absorção, influenciando a composição de ácidos gordos e teores de CLA da carne de ruminantes (Dhiman *et al.*, 1999, Bessa *et al.*, 2008).

Foi relatado que a carne de bovinos alimentados com pastagem teve uma maior concentração de ácidos gordos considerados benéficos para a saúde humana (maior proporção de ácido α -linolénico, n-3 PUFA, CLA *cis*-9, *trans*-11 e maior teor de PUFA e menor teor de SFA em particular 16:0 que a carne produzida a partir de sistemas de produção mais intensivos (Moloney *et al.*, 2004; Descalzo *et al.*, 2005).

O conteúdo e as proporções dos isómeros individuais do CLA na gordura de ruminantes, podem ser claramente afetados pela dieta (Mir *et al.*, 2004, Nuernberg *et al.*, 2007). O acabamento de ruminantes em pastagem tem sido demonstrado para aumentar os níveis de teores de CLA total (em um mg/g base de gordura), e particularmente do isómero *cis*-9,*trans*-11 (Santos-Silva *et al.*, 2002; Steen & Porter, 2003; Schroeder *et al.*, 2004; Nuernberg *et al.*, 2005; Lorenzen *et al.*, 2007).

Vários foram os fatores identificados na alteração do perfil de ácidos gordos e do conteúdo de CLA em produtos comestíveis de ruminantes, entre os quais o período de pastoreio e o tipo de forragem (French *et al.*, 2000), a estação do ano (Jahreis *et al.*, 1999), a relação volume/concentrado da dieta (Santos-Silva *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2006), a suplementação com gordura insaturada e desprotegida (Mir *et al.* 1999; Bolte *et al.* 2002) ou as fontes de lípidos suplementares (Duckett *et al.*, 2002).

Na verdade, French *et al.* (2000) e Realini *et al.* (2004) mostraram que a gordura da carne de bovino de pastoreio apresenta maiores teores de CLA (10,8 e 5,3 mg/g de gordura respetivamente) do que aqueles obtidos a partir de animais alimentados com concentrado (3,7 e 2,5mg/g de gordura). Dependendo da dieta, *trans*-7, *cis*-9 ou *trans*-11, *cis*-13 é normalmente o segundo mais abundante isómero CLA na carne de ruminantes. De acordo com Dannenberger *et al.* (2005), as diferenças encontradas nos perfis de CLA podem ser explicadas pela ingestão de pastagens distintas, uma vez que foi mostrado que a alimentação com pastagem, em comparação com alimentação concentrada, aumenta a proporção de *trans*-11, *cis*-13, *trans*-11, *trans*-13 e *trans*-12, *trans*-14 isómeros CLA (indicadores de consumo de pastagem), e diminui a percentagem do isómero *trans*-7, *cis*-9, em lípidos da carne.

Ao contrário, menor teor de CLA encontrado na carne de animais alimentados a concentrados resultando a partir do menor conteúdo PUFA em comparação com pastagem e menor pH ruminal, devido à oferta elevada proporção de concentrado (Jahreis & Kraft, 2002). De acordo

com Choi *et al.* (2005), bactérias do rúmen de vacas alimentadas com dieta de forragem produzem principalmente CLA *cis-9, trans-11* em pH superior a 6.2, mas as de vacas alimentadas com concentrado produzem mais CLA *trans-10, cis-12* que CLA *cis-9, trans-11* em pHs mais baixos.

Os dados obtidos reforçam os resultados anteriores que sugeriam que a carne de animais de pastoreio apresenta melhor qualidade nutricional (teores mais elevados de n-3 PUFA e CLA) do que a carne de animais alimentados a concentrado. Este facto traduz os efeitos benéficos da pastagem no perfil de ácidos gordos da carne.

1.4 Deposição de ácidos gordos nos eritrócitos

Nos últimos anos, a composição de ácidos gordos da carne tem recebido particular atenção devido aos seus efeitos na saúde. Como consequência destes efeitos, torna-se necessário produzir carne com perfis de AG mais benéficos à saúde. As potenciais estratégias de produção de carne com um perfil de AG mais benéfico são difíceis de implementar na prática pois só é possível conhecer a constituição do músculo após a biópsia ou *post-mortem*, não sendo assim fácil corrigir possíveis desvios ao planeado. Surge assim a hipótese de ser possível correlacionar os ácidos gordos dos eritrócitos com os ácidos gordos do músculo. Através de uma análise sanguínea poderíamos prever a composição em AG do músculo através da composição em AG dos eritrócitos. A análise sanguínea seria um método mais rápido, acessível e pouco invasivo de controlo dos objetivos produtivos.

O perfil da composição de AG do tecido adiposo é um índice válido para aferir a composição de AG da dieta ingerida por adultos Humanos (Staveren *et al.*, 1986; Riboli E. *et al.*, 1987), e isto significa que a biópsia do tecido adiposo subcutâneo pode ser particularmente útil para estudos de efeitos da qualidade da gordura da dieta a longo prazo (Marckmann, 1999). Contudo, a recolha de amostras de sangue é mais aceitável que a excisão ou aspiração do tecido adiposo e a medição dos AG no plasma ou nas membranas dos eritrócitos podem ser mais viáveis em estudos epidemiológicos de grande escala se for possível substituir o tecido adiposo pelo plasma ou pelos eritrócitos.

A composição de ácidos gordos de lipídios séricos tem sido considerada um índice confiável refletindo a ingestão dietética de ácidos gordos em períodos de semanas ou meses (Arab, 2002; Zeleniuch-Jacquotte *et al.*, 2000).

Os eritrócitos têm recebido um particular interesse por três razões: devido à sua membrana ser constituída por uma fração lipídica, pelas taxas de transferência de muitos constituintes do plasma por esta membrana poderem ser afetadas por alterações químicas na membrana lipídica, que rapidamente troca o colesterol livre com as lipoproteínas do soro, ao contrário de outros tecidos, e por ter uma capacidade muito reduzida de sintetizar e incorporar ácidos gordos em fosfolípidos.

A existência de correlações entre a composição em AG do sangue e dos eritrócitos com o tecido adiposo e, eventualmente, tecido muscular deve ser explorada com fim a desenvolver métodos de previsão da qualidade da carne.

A possível correlação entre o perfil de AG 18:1 *trans* dos eritrócitos com o perfil de AG 18:1 *trans* do músculo foi tema já abordado em dois ensaios muito recentes. Aldai *et al.* (2012), explora a utilização os eritrócitos como amostra não destrutiva para a previsão do perfil do isómero *trans* 18:1 na carne de bovino. Mais recentemente Mapiye *et al.* (2012) apresentaram no congresso mundial da carne (IcoMST) as modificações do perfil dos isómeros 18:1 *t9*, 18:1 *t10* e 18:1 *t11* em eritrócitos durante um período de alimentação de dois meses relacionando-os com os perfis de 18:1 *trans* da carne. Estes trabalhos confirmam o potencial de utilização da composição em 18:1 *trans* dos eritrócitos para prever a composição destes isómeros na carne.

1.4.1 Constituição lipídica dos eritrócitos

Os lípidos dos eritrócitos bovinos são constituídos por cerca de 56 a 66% de fosfolípidos e 28 a 32% de colesterol livre (Christie, 1981). Fosfolípidos são elementos estruturais das membranas, a fluidez e a permeabilidade da membrana estão relacionadas com o grau de saturação e insaturação dos diversos ácidos gordos dos fosfolípidos. Os fosfolípidos têm também um papel importante na trombose, devido ao seu papel na coagulação sanguínea e agregação plaquetária. Os PUFA servem como precursores de prostaglandinas, que participam em diversas funções fisiológicas da circulação, incluindo a agregação plaquetária e formação de trombos.

Esfingomielina e da fosfatidiletanolamina foram os principais componentes de fosfolípidos em eritrócitos de bovinos. (Christie, 1981)

Nos eritrócitos de bovinos, o somatório de ácidos gordos que apresentou maior expressão foram os SFA 49.6 ± 0.8 , seguidos dos MUFA ($33,4 \pm 0,8$) (Tabela 2). O ácido 18:1 constitui a maior proporção nos MUFA com $26,2 \pm 0,5$. Entre os SFA, o ácido palmítico 16:0 ($15,2 \pm 0,3$) apresentou maior percentagem.

Tabela 1 – Composição Individual de cada classe de fosfolípidos de eritrócitos de bovinos (mol % total de fosfolípidos de eritrócitos) (Adaptado de Christie, 1981).

Fosfolípidos	mol %
Fosfatidilcolina	5,8
Fosfatidiletanolamina	27,4
Fosfatidilserina	11,8
Fosfatidilinositol	2,6
Ácido fosfatídico	2,2
Esfingomielina	46,6
Lisofosfatidilcolina	2,6

Tabela 2 – Proporção dos principais ácidos gordos na membrana dos eritrócitos em bovinos (mol/100 mol ácidos gordos) (Adaptado de Stangl *et al.*, 1999).

Ácidos Gordos	mol / 100 mol AG
Total de SFA ¹	49,6 ± 0,8
16:0	15,2 ± 0,3
18:0	12,9 ± 0,5
Total MUFA ²	33,4 ± 0,8
16:1	1,38 ± 0,05
18:1	26,2 ± 0,5
Total PUFA ³	17,0 ± 1,2
18:2 n-6	11,8 ± 0,8
20:4 n-6	4,40 ± 0,41

SFA¹ Saturated fatty acid, MUFA² Monounsaturated fatty acids, PUFA³ Polyunsaturated fatty acids

Dentro das classes de fosfolípidos presentes nos eritrócitos de bovinos, destaca-se a esfingomielina, representa cerca de 46,6 % do total de fosfolípidos. Esta classe de fosfolípidos caracteriza-se pela presença dos ácidos gordos 24:0 e 24:1 (Stangl *et al.*, 1999; Sako *et al.*, 1989; O’Kelly, 1979). A esfingomielina possui tempos de reação de derivatização elevados, não estando por vezes presente em alguns estudos.

Tabela 3 – Proporção dos principais ácidos gordos nos fosfolípidos fosfatidiletanolamina e esfingomielina na membrana dos eritrócitos em bovinos (mol/100 mol ácidos gordos) (Adaptado de Stangl *et al.*, 1999).

Ácidos Gordos	Fosfatidiletanolamina	Esfingomielina
Total SFA ¹	23,0 ± 1,3	75,1 ± 0,4
16:0	8,14 ± 0,72	25,2 ± 0,7

18:0	13,6 ± 0,8	4,39 ± 0,21b
24:0	-	31,7 ± 0,8
Total MUFA ²	45,0 ± 1,6	23,9 ± 0,4
18:1	43,4 ± 1,5	30,1 ± 1,6
24:1	-	22,8 ± 0,4
Total PUPA ³	32,0 ± 1,3	0,41 ± 0,05
18:2 (n-6)	16,3 ± 0,9	0,41 ± 0,05
20:4 (n-6)	14,6 ± 0,6	-

SFA¹ Saturated fatty acid MUFA² Monounsaturated fatty acids PUPA³ - Polyunsaturated fatty acids

1.4.2 Turnover dos eritrócitos e seus fosfolípidos

Os eritrócitos são sintetizados na medula óssea, e a sua principal função é o transporte de oxigénio às células do organismo. Demora cerca de 7 dias a formar-se e possui um tempo de vida útil de 160 dias. A composição em ácidos gordos dos seus fosfolípidos (PL) será certamente determinada pelo perfil de AG disponíveis na medula óssea aquando da sua formação. Contudo, alguns estudos demonstraram que ácidos gordos exógenos podem ser incorporados em fosfolipídios da membrana de eritrócito circulantes, mas ainda não definiu claramente a via pelo qual ocorre a incorporação de ácidos gordos (Mulder *et al.*, 1965, Shohet *et al.*, 1970, Shohet *et al.*, 1970; Mulder *et al.*, 1965, Renooij *et al.*, 1974).

O *turnover* dos fosfolípidos da membrana plasmática dos eritrócitos de mamíferos deve ocorrer apenas *in situ* (na membrana) uma vez que estas células não possuem outras membranas nem organelas. Além disso, o *turnover* de fosfolípidos *in situ* deverá ser condicionado pela hidrólise de fosfolípidos endógenos e pela reciclagem dos lisofosfolípidos (Mulder *et al.*, 1965; Mulder *et al.*, 1965) e/ou a troca de moléculas fosfolipídicas intactas com fosfolípidos exógenos já que estas células não podem alterar o comprimento da cadeia de AG ou o grau de insaturação ou sintetizar fosfolípidos *de novo* (Shohet *et al.*, 1970; Mulder *et al.*, 1965; Renooij *et al.*, 1976).

Estudos recentes em uma variedade de sistemas biológicos, incluindo os eritrócito de mamíferos, têm mostrado que as mudanças no *turnover* de AG da membrana fosfolipídica e da composição da membrana, influenciam as propriedades da membrana (Horwitz *et al.*, 1974; Bloj *et al.*, 1973).

2. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi explorar a possibilidade de utilizar o perfil de ácidos gordos dos eritrócitos como indicador não invasivo da composição de ácidos gordos da carne de bovinos. A necessidade de antecipar a composição em ácidos gordos da carne bovina surge no contexto da implementação de estratégias de diferenciação da carne bovina com enriquecimento em ácidos gordos bioativos, como os ácidos gordos polinsaturados ómega-3 (n-3) e CLA. Neste caso, dispor de um meio alternativo à biopsia, procedimento demasiado invasivo, para poder aferir *in vivo* o grau de acumulação de AG alvo pode ser determinante para assegurar o correto momento de abate de modo a obter a carne com as características pretendidas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Desenho Experimental do Projeto

O presente trabalho foi realizado em amostras de carne e sangue recolhidas no âmbito de um ensaio em bovinos realizado na ex-Estação Zootécnica Nacional sob coordenação do Prof. José António Mestre Prates (Projeto PTDC/CVT/66114/2006 – Projeto base: Estudo integrado da composição lipídica e da sua regulação genética em carnes de bovino com Denominação de Origem Protegida (DOP), Barrosã e Alentejana – Ensaio de Raças Autóctones de Bovinos). De forma resumida, 40 bovinos de sexo masculino das raças Alentejana e Barrosã foram alojados em 8 parques adjacentes, com 5 animais cada, em função da raça e da dieta administrada. Estes foram sujeitos a dietas distintas, à base de concentrado e de forragem, desde o desmame (6 meses) até à idade de abate dos novilhos (18 meses), segundo o delineamento experimental apresentado no Tabela 4.

Tabela 4 - Delineamento experimental do ensaio em bovinos autóctones de raças Alentejana e Barrosã.

Grupos e Dietas	Nº Animais
Alentejana a dieta 70% de concentrado + 30% de forragem	10
Alentejana a dieta 30% de concentrado + 70% de forragem	10
Barrosã a dieta 70% de concentrado + 30% de forragem	10
Barrosã a dieta 30% de concentrado + 70% de forragem	10

O valor calórico das dietas em concentrado e em forragem é de 10 e 8 MJ/kg de matéria seca, respetivamente.

3.2 Recolha e processamento das amostras

A recolha de amostras de sangue foi efetuada nos animais ainda vivos, uma semana antes do abate. Após a recolha, procedeu-se a uma centrifugação da amostra seguida de uma decantação do plasma, os eritrócitos foram colhidos para um criotubo, submetidos a um banho

de azoto líquido e conservados - 80 °C. Após liofilização dos eritrócitos, foi efetuada a transesterificação combinada dos ácidos gordos.

No final do ensaio e após o abate dos animais, foram feitas recolhas de amostras de tecido muscular (*longissimus dorsi*). As alíquotas destinadas à caracterização da composição lipídica (ácidos gordos, isómeros de CLA) foram embaladas a vácuo e conservadas a -70°C.

Após liofilização das amostras de tecido muscular, foi efetuada a extração dos lipídios totais. Seguidamente procedeu-se à separação dos lípidos neutros e polares e à transesterificação combinada dos ácidos gordos.

A quantificação do perfil dos isómeros do CLA foi efetuada por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) e o perfil de FAME foi efetuada por cromatografia gasosa (GC).

3.3 Procedimentos analíticos

3.3.1 Extração dos lipídios totais

Os lípidos totais foram extraídos utilizando o método de Folch et al. (1957) com as adaptações efetuadas no laboratório de metabolismo lipídico da antiga Estação Zootécnica Nacional(2006)(http://www.inrbpt/fotos/editor2/inia/prestacao_de_servicos_analoses/lml_metodos_laboratorais.pdf) e posteriormente adotadas no Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Medicina Veterinária. Resumidamente, colocou-se 500 mg de músculo liofilizado em tubos de 16 ml aos quais se adicionou 2,5 ml de metanol. Após agitação, juntou-se à mistura 5 ml diclorometano, agitando novamente. Procedeu-se uma centrifugação para separar a fase sólida, retirando o máximo de solvente. A fase sólida foi re-extraída mais duas vezes, agitando novamente a mistura. No tubo onde se recolheu a fase líquida, foi adicionado 3 ml de solução de cloreto de sódio 0,8% e após agitação as fase orgânica e aquosa foram separadas por centrifugação. A fase orgânica foi recolhida e filtrada através de um filtro separador de fase, e posteriormente evaporado em evaporador rotativo até à secura para análise ponderal.

3.3.2 Separação/doseamento dos lipídios neutros e polares

Os lípidos extraídos foram separados em lípidos neutros e lípidos polares. A fração de lípidos neutros foi eluída com diclorometano e a fração de lípidos polares com metanol.

3.3.3 Transesterificação combinada dos ácidos gordos totais do músculo e dos eritrócitos

Os lípidos neutros e os lípidos polares, assim como os lípidos extraídos dos eritrócitos foram transesterificados com metóxido de sódio seguido de ácido clorídrico em metanol (1:1 v / v), como descrito por Raes *et al.* (2001).

Resumidamente adicionou-se a 250mg de amostra liofilizada 1ml de tolueno, de seguida adicionou-se 100 µl do FAME C19:0 20mg/ml em *n*-hexano. Após agitação, adicionou-se 3 ml de solução de metóxido de sódio 0,5 M. Após serem retirados da estufa, adicionou-se 2 ml HCL/metanol (1/1,v/v), agitou-se e colocou-se os tubos novamente na estufa. No fim da reação adicionou-se 2 ml de água *Milli Q*.

Extraiu-se com 2 x 3 ml hexano, agitou-se a mistura e procedeu-se a centrifugação, recolheu-se os sobrenadantes para o tubo de 16ml.

Adicionou-se 0,5 g de sulfato de sódio anidro à fase orgânica. Após agitação, centrifugou-se a mistura e aspirou-se o solvente para tubo graduado. Após filtração dividiu-se em duas alíquotas de 1ml (1 vial para GC e 1 vial para HPLC).

3.4. Análise Estatística

Os AG dos eritrócitos foram comparados com os AG das fração de lípidos polares e neutros da carne e lípidos totais da carne, inicialmente utilizando o PROC GLM do SAS, o modelo em que considera apenas o efeito da origem (eritrócito, lípidos neutros da carne, lípidos polares da carne e lípidos totais), recorrendo a contrastes ortogonais: C1 – contraste “Eritrócitos vs, Neutros”, C2 – contraste “Eritrócitos vs, Polares”, C3 - contraste “Eritrócitos vs, Totais”. Na tabela foram apresentadas as médias ajustadas (Least square means) e os erros padrões das médias.

As correlações entre AG dos eritrócitos e AG de cada uma das frações da carne foram exploradas recorrendo a correlações de Pearson utilizando o PROC CORR do SAS. Os coeficientes de correlação obtidos foram apresentados em tabela.

Finalmente, foram ajustadas regressões lineares múltiplas para estimar a composição de ácidos gordos da carne utilizando o PROC REG do SAS. As variáveis foram selecionadas por processo de “stepwise” com limiar de significância de ($P < 0,10$).

4. RESULTADOS

O teor médio de lípidos totais das amostras de carnes utilizadas apresentou uma grande amplitude, variando entre 28 e 128 mg/g MS de carne, apresentado um valor médio de 66 mg/g de MS de carne. O teor de lípidos polares foi relativamente constante, apresentando um valor médio de 17,5 mg/g MS de carne variando entre 9,6 e 28,7 mg/g de carne. Os lípidos neutros apresentaram uma grande amplitude à semelhança dos lípidos totais, variando entre 14,3 e 109,2 mg/g MS de carne.

Na Tabela 5, apresenta-se a composição em ácidos gordos (AG) e dimetilacetais (DMA) (em % do total de área do ácidos gordos e dimetiacetais) dos eritrócitos, dos lípidos totais da carne e das frações lipídicas neutras e polares da carne. Os contrastes ortogonais apresentados, comparam a composição de AG dos eritrócitos com a dos lípidos neutros (C1), lípidos polares (C2) e lípidos totais (C3). Para a maioria dos AG observaram-se diferenças significativas entre a sua concentração relativa nos eritrócitos e nos lípidos neutros e polares. Nos lípidos neutros os DMA 16:0, DMA 18:0, 18:1 *trans*-6 a 8, 18:1 *cis*-12, 20:0, 20:1 *cis*-11, 18:2 *trans*-12, *trans*-14, 18:2 *trans*-10, *trans*-12, 18:2 *trans*-7, *trans*-9 e 18:2 *trans*-7, *cis*-9 não apresentaram concentrações relativas significativamente diferentes das observadas nos eritrócitos. Nos lípidos polares os AG que se seguem são aqueles que não apresentam diferenças significativas: 14:1 *cis*-9, 15:0, 16:1 *cis*-9, 18:1 *trans*-6 a 8, 18:1 *cis*-12, 20:1 *cis*-11, 20:4 n-6, 20:5 n-3, 22:6 n-3, 18:2 *trans*-7, *trans*-9.

Podemos também observar através da Tabela 5 que os ácidos gordos dos eritrócitos diferem significativamente dos ácidos gordos da fração dos lípidos totais exceto os ácidos gordos 17:0, 18:1 *trans* 6 a 8, 18:1 *cis*-9, 18:1 *cis*-12, 20:0, 20:1 *cis*-11, 20:3n-6, 22:5 n-3, 18:2 *trans*-10, *trans*-12, 18:2 *trans*-7, *trans*-9, 18:2 *trans*-7, *cis*-9. Os somatórios MUFA *cis*-9 não apresentam diferenças significativas entre os ácidos gordos destas frações.

Tabela 5 – Composição em ácidos gordos (% do total de AG) dos eritrócitos em comparação com a composição em ácidos gordos das frações lipídicas neutras e polares e dos lípidos totais da carne (*longissimus dorsi*) de bovino.

	Eritrócitos	Carne			EPM	C1	C2	C3
		Neutros	Polares	Totais				
14:0	0,76	3,03	0,38	2,35	0,052	<0,001	<0,001	<0,001
14:1 <i>cis</i> -9	0,09	0,46	0,16	0,39	0,018	<0,001	0,002	<0,001
15:0	0,17	0,33	0,14	0,28	0,009	<0,001	0,005	<0,001
DMA-16:0	0,54	0,26	8,16	2,22	0,104	0,053	<0,001	<0,001
16:0	8,07	27,0	17,83	24,59	0,226	<0,001	<0,001	<0,001
16:1 <i>cis</i> -7	0,19	0,25	0,39	0,29	0,009	<0,001	<0,001	<0,001
16:1 <i>cis</i> -9	1,16	3,24	1,12	2,69	0,071	<0,001	0,524	<0,001
17:0	0,71	0,92	0,36	0,77	0,021	<0,001	<0,001	0,005
DMA-18:0	0,35	0,29	3,66	1,14	0,082	0,602	<0,001	<0,001
17:1 <i>cis</i> -9	0,61	0,85	0,83	0,82	0,029	<0,001	<0,001	<0,001
18:0	18,16	16,2	7,52	13,9	0,236	<0,001	<0,001	<0,001
18:1 <i>trans</i> -6 a -8	0,13	0,14	0,17	0,15	0,0099	0,479	0,029	0,412
18:1 <i>trans</i> -11	0,54	1,40	0,29	1,13	0,049	<0,001	<0,001	<0,001
18:1 <i>cis</i> -9	30,5	34,8	19,1	30,7	0,437	<0,001	<0,001	0,792
18:1 <i>cis</i> -11	1,84	3,67	2,7	3,44	0,102	<0,001	<0,001	<0,001
18:1 <i>cis</i> -12	0,66	0,63	0,66	0,64	0,037	0,616	0,925	0,710
18:2n-6	22,84	2,46	20,84	7,16	0,462	<0,001	<0,001	<0,001
20:0	0,14	0,10	0,22	0,12	0,014	0,083	<0,001	0,285
18:3n-3	0,73	0,27	0,99	0,48	0,039	<0,001	<0,001	<0,001
20:1 <i>cis</i> -11	0,1	0,11	0,08	0,10	0,0055	0,014	0,067	0,285
20:2n-6	0,11		0,18	0,04	0,007		<0,001	<0,001
20:3n-6	0,61		1,86	0,33	0,188		<0,001	0,293
20:4n-6	7,66	0,32	6,82	2,13	0,198	<0,001	0,003	<0,001
20:5n-3	0,53		0,62	0,16	0,027		0,004	<0,001
22:4n-6	0,34		0,70	0,17	0,022		<0,001	<0,001
22:5n-3	0,41		1,26	0,35	0,045		<0,001	0,316
22:6n-3	0,16		0,13	0,04	0,015		0,137	<0,001
18:2 <i>trans</i> -12, <i>trans</i> -14	0,0035	0,0032		0,0023	0,0002	0,254		<0,001
18:2 <i>trans</i> -11, <i>trans</i> -13	0,0084	0,0048		0,0035	0,0007	<0,001		<0,001
18:2 <i>trans</i> -10, <i>trans</i> -12	0,0039	0,0043		0,0031	0,0004	0,452		0,144
18:2 <i>trans</i> -9, <i>trans</i> -11	0,0160	0,0070		0,0052	0,0011	<0,001		<0,001
18:2 <i>trans</i> -7, <i>trans</i> -9	0,005	0,004	0,02	0,007	0,0013	0,756	<0,001	0,324
18:2 <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11	0,67	0,32	0,13	0,28	0,021	<0,001	<0,001	<0,001
18:2 <i>trans</i> -7, <i>cis</i> -9	0,016	0,04	0,05	0,032	0,008	0,052	0,002	0,127
Somatórios				10,9				
PUFA	33,35	3,05	33,7		0,532	<0,001	0,56	<0,001
n-3 PUFA	1,79	0,27	2,95	1,01	0,084	<0,001	<0,001	<0,001
n-6 PUFA	31,22	2,78	2,97	9,66	0,516	<0,001	0,007	<0,001
SFA	27,97	47,63	26,46	42,03	0,328	<0,001	<0,001	<0,001
<i>cis</i> -9 MUFA	32,41	39,35	21,21	34,6	0,489	<0,001	<0,001	<0,001
CLA	0,78	0,41	0,27	0,37	0,0254	<0,001	<0,001	<0,001
Total <i>trans</i>	0,68	1,55	0,46	1,28	0,0493	<0,001	<0,001	<0,001
Razões								
n-6/n-3	18,42	10,34	11,95	10,12	0,937	<0,001	<0,001	<0,001
P/S	0,87	0,06	0,85	0,19	0,0178	<0,001	0,2559	<0,001

EPM – erro padrão da média, C1 – contraste “Eritrócitos vs, Neutros”, C2 – contraste “Eritrócitos vs, Polares”, C3 - contraste “Eritrócitos vs, Totais”

4.1 Correlações entre a composição em ácidos gordos dos eritrócitos e do músculo

4.1.1 Correlações eritrócitos vs. lípidos neutros da carne

A tabela 6 apresenta as correlações entre as concentrações relativas de ácidos gordos selecionados dos eritrócitos com as dos lípidos neutros da carne. As correlações que apresentam significâncias estatísticas ($p < 0.05$) estão apresentadas a negrito. Das 273 correlações apresentadas observaram-se 69 correlações estatisticamente significativas. Os AG gordos que apresentam maior número de correlações são os isómeros conjugados do ácido linoleico (CLA), que estão correlacionados entre si, mas também com o 18:1 *trans-11*, 18:0 e 18:1 *cis-9*. Dentro dos isómeros CLA distinguem-se dois grupos: a) O grupo constituído pelo CLA *cis-9,trans-11*, CLA *trans-11,cis-13*, CLA *trans-9,trans-11*, CLA *trans-11,trans-13* e *trans-12,trans-14*, cujas concentrações nos eritrócitos, apresentam correlações positivas com as concentrações nos lípidos neutros da carne de 18:1 *trans-11* e negativas com concentrações nos lípidos neutros da carne de 18:0; b) o grupo constituído pelos CLA *trans-10,cis-12*, CLA *trans-8,trans-10* e pelo CLA *trans-10,cis-12* cujas concentrações nos eritrócitos que apresentam correlações negativas com o 18:1 *trans-11* e com o 18:1 *cis-9* presentes nos lípidos neutros da carne.

Podemos também observar através da tabela 6 que estes dois grupos descritos anteriormente apresentam também correlações significativas entre as suas concentrações nos eritrócitos com as concentrações de isómeros de CLA dos lípidos neutros: o grupo a) apresenta correlações positivas com um grupo de isómeros de CLA (CLA *trans-9,trans-11*, CLA *trans-12,cis-14*, CLA *trans-11,cis-13* e CLA *cis-9,trans-11*) e o grupo b) apresenta correlações negativas com o mesmo grupo de isómeros de CLA.

A concentração relativa do 18:2 n-6 nos eritrócitos apresenta uma correlação significativa de 0,46 e 0,36 com a concentração de 18:2 n-6 e 20:4 n-6 nos lípidos neutros da carne. De igual modo, a concentração relativa do 18:3 n-3 nos eritrócitos apresenta uma correlação significativa de 0,40 com a concentração de 18:3 n-3 nos lípidos neutros da carne.

Os restantes AG ou não apresentam correlações significativa (16:0, 18:0, 20:4 n-6, 22:4 n-6 e 22:5 n-3) entre as suas concentrações nos eritrócitos e as concentrações dos diversos ácidos gordos dos lípidos neutros da carne ou no caso do 14:0, 15:0, 20:0 apresentam apenas um número reduzido de correlações significativas com os ácidos gordos dos lípidos neutros.

Tabela 6 - Os Coeficiente de Correlação entre as concentrações relativas de ácidos gordos seleccionados dos eritrócitos com as dos lípidos neutros da carne.

	n-14:0	n-16:0	n-18:0	n-18:1t11	n-18:1c9	n-18:2n6	n-18:3n3	n-20:4n6	n-CLAt9t11	n-CLAt12c14	n-CLAt11c13	n-CLAt10c12	n-c9t11
e-14:0	-0.17	-0.27	0.02	-0.02	0.34	-0.09	-0.27	-0.22	0.20	-0.26	0.22	0.19	0.09
e-15:0	0.00	0.28	0.16	-0.61	-0.09	-0.10	-0.05	-0.06	-0.12	-0.13	-0.38	0.10	-0.42
e-16:0	0.06	0.18	-0.12	0.06	0.14	-0.13	-0.28	-0.22	0.22	-0.19	0.11	0.08	0.13
e-18:0	-0.20	-0.16	0.18	-0.05	-0.19	0.14	0.26	0.20	-0.29	0.11	-0.05	-0.02	-0.14
e-20:0	-0.05	-0.39	-0.31	0.37	0.31	0.08	-0.11	-0.06	0.30	-0.25	0.34	0.34	0.28
e-18:1c9	0.15	0.31	0.25	-0.12	-0.01	-0.35	-0.01	-0.20	0.08	0.25	-0.18	-0.27	-0.04
e-18:2n6	-0.28	-0.37	0.00	-0.14	-0.16	0.46	0.08	0.36	-0.20	-0.22	0.02	0.29	-0.20
e-20:4n6	0.14	0.02	-0.14	0.21	0.14	-0.13	0.03	-0.12	0.18	-0.01	0.09	-0.14	0.11
e-22:4n6	0.16	0.03	0.05	-0.09	-0.08	0.12	-0.16	0.03	-0.25	-0.26	-0.04	0.11	-0.10
e-18:3n3	-0.13	0.23	0.22	-0.21	-0.09	-0.19	0.40	-0.14	-0.25	0.34	-0.43	-0.23	-0.18
e-20:5n3	0.09	0.35	-0.18	0.23	0.24	-0.48	0.12	-0.41	0.09	0.36	0.16	-0.25	0.29
e-22:5n3	0.14	0.09	-0.01	0.01	-0.05	-0.04	0.25	-0.07	0.05	0.02	-0.19	-0.05	-0.05
e-22:6n3	0.06	0.37	-0.01	-0.22	-0.02	-0.26	-0.03	-0.22	-0.07	-0.02	0.01	0.07	0.09
e-CLAt12t14	0.17	-0.19	-0.33	0.43	0.41	-0.18	-0.9	-0.27	0.39	0.07	0.43	0.16	0.52
e-CLAt11t13	-0.12	-0.13	-0.37	0.42	0.39	-0.17	0.18	-0.23	0.25	0.40	0.50	-0.05	0.49
e-CLAt10t12	-0.06	0.03	0.18	-0.70	-0.43	0.41	0.11	0.53	-0.38	-0.09	-0.25	0.10	-0.60
e-CLAt9t11	0.21	0.01	-0.38	0.67	0.47	-0.37	-0.11	-0.49	0.48	0.21	0.42	-0.02	0.75
e-CLAt8t10	-0.01	-0.11	0.25	-0.66	-0.61	0.66	0.03	0.74	-0.44	-0.41	-0.39	0.14	-0.73
e-CLAt11c13	0.23	0.11	-0.22	0.76	0.01	-0.23	0.23	-0.27	0.14	0.44	0.27	-0.21	0.61
e-CLAt10c12	0.08	-0.12	0.08	-0.75	-0.36	0.51	-0.18	0.60	-0.24	-0.40	-0.27	0.34	-0.64
e-CLAc9t11	0.41	0.18	-0.34	0.71	0.05	-0.16	0.03	-0.19	0.24	0.32	0.29	-0.17	0.65

4.1.2 Correlações eritrócitos vs. lípidos polares da carne

A tabela 7 apresenta as correlações entre os ácidos gordos selecionados dos eritrócitos e os ácidos gordos da fração lipídica polar da carne. As correlações que apresentam significâncias estatísticas ($p < 0,05$) estão apresentadas a negrito. Das 391 correlações apresentadas observaram-se 87 correlações estatisticamente significativas.

Podemos observar que o 18:1 *cis*-9 nos eritrócitos está correlacionado positivamente ($r = 0,44$) com o 18:1 *cis*-9 e negativamente ($r = -0,36$) com o 18:2 n-6 dos lípidos polares. O mesmo padrão observou-se para o 18:2 n-6, pois a sua concentração nos eritrócitos também está correlacionada ($r = 0,57$) positivamente com o 18:2 n-6 e negativamente ($r = -0,52$) com o 18:1 *cis*-9 dos lípidos polares. A concentração de 18:3 n-3 nos eritrócitos está correlacionada com as concentrações de 18:3 n-3 ($r = 0,54$), de 20:5 n-3 ($r = 0,50$) e 22:5 n-3 ($r = 0,45$) nos lípidos polares.

Os principais ácidos saturados dos eritrócitos apresentam correlações significativas com 18:3 n-3 nos lípidos polares da carne, sendo de -0,49 para o 16:0, de 0,35 para o 18:0.

Os AG que apresentam maior número de correlações são os isômeros conjugados do ácido linoleico (CLA), que estão correlacionados entre si, mas também com o 18:1 *trans*-6,*trans*-8 e com o 18:1 *trans*-11. Dentro dos isômeros CLA distinguem-se dois grupos: a) O grupo constituído pelo CLA *cis*-9,*trans*-11, CLA *trans*-11,*cis*-13, CLA *trans*-9,*trans*-11, CLA *trans*-11,*trans*-13 e pelo CLA *trans*-12,*trans*-14 que apresenta correlações positivas entre as suas concentrações nos eritrócitos com o 18:1 *trans*-6,*trans*-8, o 18:1 *trans*-11, o CLA *cis*-9,*trans*-11 e o CLA *trans*-7,*cis*-9 presentes nos lípidos polares da carne; b) o grupo constituído pelos CLA *trans*-10,*trans*-12, CLA *trans*-8,*trans*-10 e pelo CLA *trans*-10,*cis*-12 que apresentam correlações negativas com o 18:1 *trans*-6-*trans*-8, o 18:1 *trans*-11, o CLA *cis*-9,*trans*-11 e o CLA *trans*-7,*cis*-9 presentes nos lípidos polares da carne.

Tabela 7 - Coeficientes de Correlação entre as concentrações relativas de ácidos gordos selecionados dos eritrócitos com as dos lípidos polares da carne.

	p-14:0	p-16:0	p-18:0	p-18:1t6-t8	p-18:1t11	p-18:1c9	p-18:2n6	p-18:3n3	p-20:4n6	p-20:5n3	p-22:5n3	p-22:6n3	p-CLAt7t9	p-CLAt6t8	p-CLAc9t11	p-CLAt8c10	p-CLAt7c9
e-14:0	-0.05	-0.24	0.10	0.05	-0.09	-0.19	0.18	-0.24	0.15	-0.10	-0.15	-0.22	-0.03	-0.07	-0.06	0.09	0.05
e-15:0	0.06	0.34	-0.01	-0.08	-0.32	0.02	-0.08	0.15	-0.16	0.20	0.19	0.51	0.15	0.00	-0.22	0.14	-0.21
e-16:0	-0.11	0.09	-0.34	0.11	-0.09	-0.01	-0.16	-0.49	0.29	-0.07	-0.12	-0.10	0.05	-0.23	-0.15	0.08	0.15
e-18:0	-0.12	0.12	0.11	-0.21	-0.09	-0.11	0.22	0.35	-0.03	0.10	0.17	0.13	-0.16	0.16	-0.06	-0.04	-0.19
e-20:0	-0.21	-0.24	-0.09	0.12	0.20	-0.34	0.25	-0.40	0.30	-0.25	-0.10	-0.49	0.04	0.34	0.16	0.11	0.10
e-18:1c9	0.28	-0.05	0.20	-0.04	-0.06	0.44	-0.36	0.21	-0.08	0.22	0.11	0.15	-0.13	-0.22	-0.05	-0.17	0.06
e-18:2n6	-0.22	0.14	-0.03	-0.08	-0.14	-0.52	0.57	0.14	-0.19	-0.22	-0.21	-0.06	0.12	0.27	-0.11	0.01	-0.22
e-20:2n6	-0.06	0.22	-0.01	-0.04	0.37	0.12	-0.1	0.17	-0.02	0.16	0.28	0.35	-0.08	-0.22	0.05	0.15	-0.28
e-20:3n6	0.20	0.22	-0.02	0.03	-0.02	0.44	-0.51	-0.29	0.15	-0.17	0.07	0.01	0.07	0.07	-0.06	0.20	0.01
e-20:4n6	0.11	-0.27	0.07	0.12	0.32	0.23	-0.25	-0.18	0.16	-0.29	-0.11	-0.12	-0.06	0.01	0.23	0.16	0.02
e-22:4n6	-0.06	-0.01	0.06	0.09	-0.24	-0.03	0.00	-0.42	-0.15	0.47	0.47	0.58	0.07	0.20	-0.12	0.00	-0.01
e-18:3n3	0.07	0.17	0.14	-0.05	0.00	0.09	-0.19	0.54	0.12	0.50	0.45	0.15	0.17	-0.05	0.01	0.13	-0.21
e-20:5n3	0.21	-0.34	0.22	0.44	0.44	0.25	-0.37	0.21	0.04	0.14	0.28	0.33	0.23	0.02	0.58	0.23	0.27
e-22:5n3	0.04	-0.08	0.10	-0.05	0.29	-0.05	-0.03	0.12	0.12	0.09	0.07	-0.36	0.08	0.15	0.23	0.34	-0.10
e-22:6n3	0.10	-0.13	0.22	0.06	-0.07	0.12	-0.2	0.2	0.13	0.01	-0.07	-0.56	0.30	-0.02	0.16	0.16	0.26
e-CLAt12t14	0.03	-0.36	0.11	0.36	0.34	-0.03	-0.05	-0.37	0.14	0.27	0.17	-0.34	0.07	-0.01	0.36	0.07	0.48
e-CLAt11t13	0.23	-0.34	0.23	0.27	0.52	0.02	-0.14	-0.09	-0.33	-0.02	-0.08	0.45	0.08	0.02	0.52	0.65	0.28
e-CLAt10t12	0.16	0.54	0.01	-0.43	-0.37	0.07	0.07	0.13	0.26	0.07	0.08	-0.55	-0.02	0.15	-0.30	0.15	-0.39
e-CLAt9t11	0.05	-0.50	-0.03	0.46	0.48	0.01	-0.18	-0.26	-0.39	-0.32	-0.32	0.36	0.13	-0.08	0.49	0.05	0.56
e-CLAt8t10	0.07	-0.46	0.10	-0.56	-0.47	-0.11	0.32	0.05	-0.03	0.23	0.34	0.34	-0.18	0.10	-0.53	-0.18	-0.53
e-CLAt11c13	0.07	-0.46	0.1	0.32	0.71	0.04	-0.13	0.26	-0.11	-0.45	-0.43	-0.01	0.00	0.02	0.71	0.07	0.23
e-CLAt10c12	0.04	0.53	-0.19	-0.53	-0.51	-0.07	0.22	-0.07	-0.28	-0.25	-0.23	0.38	0.00	0.25	-0.40	-0.14	-0.49
e-CLAc9t11	0.22	-0.35	-0.12	0.30	0.65	0.13	-0.18	-0.01	0.12	0.10	0.06	-0.35	-0.07	-0.10	0.60	-0.01	0.39

4.1.3 Correlações eritrócitos vs. lípidos totais da carne

A tabela 8 apresenta as correlações entre os AG selecionados dos eritrócitos e os AG selecionados dos lípidos totais da carne. As correlações que apresentam significâncias estatísticas ($p < 0,05$) estão apresentadas a negrito. Das 572 correlações apresentadas observaram-se 139 correlações estatisticamente significativas.

O 18:2 n-6 nos eritrócitos está correlacionado positivamente ($r = 0,37$) com o 18:2 n-6 dos lípidos totais da carne. De igual modo, também se observaram correlações positivas significativas entre as concentrações de 18:3 n-3 ($r = 0,50$) e 18:1 *trans*-11 ($r = 0,64$) nos eritrócitos e nos lípidos totais da carne.

Os AG que apresentam maior número de correlações são os isômeros conjugados do ácido linoleico (CLA). Os isômeros CLA *trans*-12,*trans*-14, CLA *trans*-11,*trans*-13 e o CLA *cis*-9,*trans*-11 nos eritrócitos apresentam correlações significativas positivas com: 18:1 *trans*-11, 18:1 *cis*-9, 18:1 *cis*-11 dos lípidos total; e correlações significativas negativas com: DMA 18:0, 18:2 n-6, 20:0, 18:3 n-3, 20:2 n-6, 20:3 n-6 e com o ácido 20:4 n-6 dos lípidos totais. Contrariamente, a concentração do isômero CLA *trans*-10,*trans*-12 nos eritrócitos está negativamente correlacionada com as concentrações de 18:1 *trans*-11, 18:1 *cis*-9, 18:1 *cis*-11 nos lípidos totais; e positivamente correlacionada com as concentrações de DMA 18:0, 18:2 n-6, 20:0, 18:3 n-3, 20:2 n-6, 20:3 n-6 e com o 20:4 n-6 dos lípidos totais da carne.

Tabela 8 - Coeficientes de Correlação entre as concentrações relativas de ácidos gordos selecionados dos eritrócitos com as dos lípidos totais da carne.

	n-14:0	n-14:1 <i>cis</i> 9	n-15:0	n-DMA16:0	n-16:0	n-17:0	n-DMA18:0	n-18:0	n-18:1 <i>t</i> 11	n-18:1 <i>c</i> 9	n-18:1 <i>c</i> 11	n-18:2 <i>n</i> 6	n-20:0	n-18:3 <i>n</i> 3	n-20:2 <i>n</i> 6	n-20:3 <i>n</i> 6	n-20:4 <i>n</i> 6
e-14:0	-0.027	0.07	0.08	-0.2	-0.15	0.19	-0.12	0.1	0.02	0.17	0.29	-0.05	0.018	-0.25	-0.05	-0.08	-0.17
e-14:0 <i>cis</i> 9	-0.2	-0.2	-0.1	0.26	0.12	-0.25	0.21	0.15	-0.32	-0.07	-0.53	-0.07	0.38	0.34	0.19	0.21	0.4
e-15:0	-0.18	-0.07	0.12	0.35	0.07	0.07	0.22	-0.03	-0.59	-0.21	-0.28	0.13	0.39	0.21	0.29	0.35	0.2
e-17:0	0.06	0.07	0.25	-0.15	0.08	0.39	-0.23	0.04	-0.11	0.16	0.09	-0.18	0.22	-0.21	-0.16	-0.03	-0.13
e-DMA18:0	0.15	0.05	0.29	-0.32	-0.13	0.29	-0.25	0.17	0.41	0.09	0.38	-0.03	-0.21	-0.27	-0.21	-0.25	-0.23
e-18:0	-0.21	-0.17	-0.012	0.04	-0.16	0.11	0.2	0.15	-0.06	-0.17	-0.16	0.18	0.24	0.27	-0.06	0.06	0.14
e-18:1 <i>trans</i> 11	0.42	0.34	0.04	-0.3	0.13	-0.1	-0.32	-0.3	0.64	0.14	0.42	-0.12	-0.36	-0.24	-0.31	-0.35	-0.28
e-18:1 <i>cis</i> 9	-0.09	-0.18	-0.44	0.26	-0.01	-0.33	0.22	0.03	-0.19	-0.032	-0.39	-0.03	0.23	0.32	0.33	0.25	0.23
e-18:1 <i>cis</i> 11	0.27	0.16	0.0002	-0.32	0.15	0.08	-0.37	-0.13	0.34	0.3	0.37	-0.26	-0.32	-0.45	-0.37	0.25	-0.23
e-18:2 <i>n</i> 6	-0.21	-0.05	0.21	0.04	-0.22	0.2	0.13	0.04	-0.11	-0.28	0.09	0.37	-0.02	0.05	-0.02	-0.02	0.06
e-20:0	0.21	0.31	0.22	-0.43	-0.05	0.4	-0.36	-0.06	0.4	0.26	0.69	-0.15	-0.29	-0.46	-0.35	-0.3	-0.3
e-18:3 <i>n</i> 3	-0.32	-0.19	0.1	0.37	-0.03	0.05	0.28	0.03	-0.28	-0.25	-0.43	0.11	0.37	0.5	0.12	0.3	0.24
e-22:4 <i>n</i> 6	0.27	-0.07	0.38	-0.21	0.17	0.34	-0.26	0.2	-0.02	0.11	0.07	-0.14	0.013	-0.37	-0.12	-0.11	-0.17
e-22:5 <i>n</i> 3	0.1	0.02	0.34	0.06	0.03	0.24	0.002	0.01	-0.007	-0.07	-0.11	-0.009	0.006	0.09	0.02	0.05	-0.003
e-22:6 <i>n</i> 3	0.18	0.4	0.26	0.04	0.23	0.04	0.03	-0.04	-0.29	-0.08	-0.11	-0.08	-0.03	0.04	0.02	-0.02	-0.03
e-CLA <i>t</i> 12 <i>t</i> 14	0.46	0.45	-0.13	-0.57	0.11	0.08	-0.49	-0.1	0.51	0.49	0.57	-0.4	-0.32	-0.47	-0.46	-0.48	-0.51
e-CLA <i>t</i> 11 <i>t</i> 13	0.15	0.32	-0.08	-0.4	0.06	0.08	-0.29	-0.14	0.46	0.41	0.4	-0.32	-0.32	-0.17	-0.47	-0.41	-0.36
e-CLA <i>t</i> 10 <i>t</i> 12	-0.28	-0.23	-0.02	0.5	-0.1	0.04	0.42	-0.09	-0.68	-0.38	-0.42	0.4	0.28	0.31	0.49	0.4	0.46
e-CLA <i>t</i> 9 <i>t</i> 11	0.43	0.37	0.02	-0.5	0.17	-0.15	-0.48	-0.11	0.68	0.47	0.5	-0.46	-0.45	-0.36	-0.5	-0.45	-0.5
e-CLA <i>t</i> 7 <i>t</i> 9	-0.04	-0.001	-0.01	-0.002	0.32	-0.16	-0.04	-0.02	-0.07	0.08	-0.08	-0.24	0.13	0.08	-0.02	0	-0.05
e-CLAc9 <i>t</i> 11	0.48	0.34	-0.02	-0.28	0.23	-0.33	-0.28	-0.19	0.68	0.21	0.18	-0.29	-0.41	-0.12	-0.26	-0.34	-0.29
e-CLA <i>t</i> 7 <i>c</i> 9	0.06	0.001	0.2	-0.09	-0.14	0.22	-0.01	0.17	0.3	-0.17	0.11	0.15	-0.13	0.06	0.06	-0.14	-0.08

Tabela 8 – (Continuação)

	n-20:5n3	n-22:4n6	n-22:5n3	n-22:6n3	n- CLAt12t 14	n- CLAt11t 13	n- CLAt10t 12	n- CLAt9t1 1	n- CLAt7t9
e-14:0	-0.15	-0.12	-0.18	-0.12	-0.19	0.09	-0.004	0.27	-0.24
e-14:0 <i>cis</i> 9	0.42	0.31	0.39	0.69	0.01	0.05	-0.11	-0.26	0.28
e-15:0	0.3	0.21	0.33	0.3	-0.13	-0.14	-0.05	-0.17	0.26
e-17:0	-0.04	0.01	-0.05	0.27	0.03	-0.07	0.07	-0.11	0.09
e-DMA 18:0	-0.37	-0.23	-0.38	-0.47	-0.02	-0.18	0.05	0.23	-0.43
e-18:0	0.11	0.04	0.12	-0.1	0.14	-0.05	0.16	-0.3	0.15
e-18:1 <i>trans</i> 11	-0.3	-0.48	-0.33	-0.29	0.3	0.15	0.27	0.22	-0.27
e-18:1 <i>cis</i> 9	0.37	0.45	0.37	0.57	-0.02	0.13	-17	-0.05	0.14
e-18:1 <i>cis</i> 11	-0.22	-0.31	-0.32	-0.34	0.08	0.11	-0.1	0.11	-0.34
e-18:2n6	-0.12	-0.18	-0.11	-0.52	-0.05	-0.23	0.1	-0.16	0.12
e-20:0	-0.42	-0.35	-0.42	-0.56	-0.03	-0.07	0.07	0.41	-0.36
e-18:3n3	0.47	0.17	0.47	0.27	0.22	0.07	0.03	-0.35	0.28
e-22:4n6	-0.3	-0.07	-0.27	-0.25	0.006	-0.14	0.14	-0.14	-0.16
e-22:5n3	0.06	-0.06	0.07	-0.13	0.03	-0.02	-0.05	0.06	0.04
e-22:6n3	0.047	-0.003	0.05	0.1	0.04	0.15	0.1	-0.05	0.28
e-CLAt12t14	-0.37	-0.48	-0.45	-0.25	-0.04	0.27	-0.001	0.52	-0.4
e-CLAt11t13	-0.15	-0.39	-0.24	-0.26	0.05	0.34	-0.01	0.35	-0.14
e-CLAt10t12	0.3	0.37	0.35	0.1	-0.18	-0.24	-0.17	-0.43	0.51
e-CLAt9t11	-0.28	-0.45	-0.36	-0.04	0.15	0.32	0.17	0.57	-0.39
e-CLAt7t9	0.16	0.06	0.18	0.29	0.31	0.03	0.36	-0.28	0.18
e-CLAc9t11	-0.16	-0.34	-0.22	-0.02	0.23	0.21	0.11	0.28	-0.29
e-CLAt7c9	-0.23	-0.19	-0.15	-0.25	0.05	0.12	0.13	0.12	-0.22

4.2 Regressões múltiplas para previsão da concentração de ácidos gordos na carne através do perfil dos eritrócitos

As equações de regressão múltipla obtidas para estimar a composição de ácidos gordos dos da carne estão apresentadas na Tabela 9. A maioria das equações inclui 4 ou mais ácidos gordos dos eritrócitos como variáveis independentes, selecionadas por processo de “stepwise” com limiar de significância de ($P < 0,10$). Os coeficientes de determinação ajustados são baixos quando se pretende estimar os ácidos gordos saturados (0,14), monoinsaturados da carne (0,34), e ácidos gordos polinsaturados n-6. Contudo para os ácidos gordos polinsaturados n-3 e para o CLA e seu precursor (18:1 *trans-11*) os coeficientes de determinação ajustados são francamente mais elevados, variando entre 0,57 e 0,78.

Na Tabela 10, apresentam-se os coeficientes de determinação e as variáveis independentes selecionadas nas equações de regressão múltipla aplicadas à previsão dos ácidos gordos dos lípidos totais da carne, e frações polares e neutras, quando se inclui ou não a informação obtida com recurso à análise detalhada dos isómeros de CLA por HPLC. Em geral os coeficientes de determinação são superiores quando se utiliza a informação obtida por HPLC.

Nos lípidos totais da carne, os coeficientes de determinação com recurso à informação obtida por HPLC variam de 0,57 a 0,78. Apresentando o valor mais baixo para o rácio n6/n3 e o valor mais elevado para o isómero 18:1 *trans-11*. Observamos ainda que os coeficientes de determinação com recurso à informação recolhida por HPLC são idênticos para o CLA e para o ácido linolénico 18:3 n-3. A diferença nos valores apresentados dos coeficientes de determinação com e sem recurso à informação obtida por HPLC é superior para o CLA e o seu precursor, 0,26 e 0,21 respetivamente.

Nos lípidos polares, podemos verificar que no 18:3 n-3 o coeficiente de determinação é superior sem o recurso à informação recolhida por HPLC (0,80). Os coeficientes de determinação com recurso à informação obtida por HPLC apresentam valores superiores para o CLA e para os ácidos polinsaturados de cadeia longa n-3, 0,81 e 0,77 respetivamente. No caso do n-3 PUFA, os valores dos coeficientes de determinação com ou sem recurso à informação obtida por HPLC são idênticos.

O coeficiente de determinação com recurso à informação recolhida por HPLC é superior no CLA e 18:1 *trans-11*, 0,79 e 0,88 respetivamente nos lípidos neutros. Apresentando um valor muito baixo no coeficiente de determinação com recurso à informação obtida por HPLC de 0,31 no ácido linolénico 18:3 n-3.

Tabela 9 – Equações de regressão múltipla para previsão da composição em ácidos gordos dos lípidos totais da carne através da composição em ácidos gordos dos eritrócitos.

Variável dependente	Equação de regressão múltipla	R ²	r ² adj.
CLA total	$0,037(\pm 0,0567) + 0,0438 (\pm 0,146) t9t11 + 0,347 (\pm 0,106) C18:1 t11 + 0,44 (\pm 0,187) t11t13 + 0,27 (\pm 0,122) C22:6 n3$	0,675	0,6367
CLAc9t11	$-0,35 (\pm 0,203) + 0,53(\pm 0,125) t9t11m + 0,26 (\pm 0,085) C18:1 t11 + 0,38 (\pm 0,146) t11t13m + 0,28 (\pm 0,097) C22:6 n3 + 0,02 (\pm 0,011) C18:0$	0,751	0,714
18:1 t11	$-3,36 (\pm 1,086) + 0,98 (\pm 0,214) CLA - 5,94 (\pm 1,248) t10t12m + 1,55 (\pm 0,649) C20:2 n6 + 0,06 (\pm 0,021) n6n3 + 1,07 (\pm 0,433) t11t13m + 0,08 (\pm 0,032) C18:0 + 0,56 (\pm 0,229) n3PUFA$	0,822	0,782
Total trans	$2,49 (\pm 0,577) + 0,693 (\pm 0,235) CLA - 4,89 (\pm 1,518) t10t12m + 1,96 (\pm 0,715) C20:2 n6 - 0,044 (\pm 0,0167) c9 MUFA - 1,98 (\pm 0,848) C15:0$	0,756	0,719
18:3 n3	$-0,963 (\pm 0,287) + 0,42 (\pm 0,084) C18:3 n3 + 0,06 (\pm 0,009) C18:1 c9 - 0,53 (\pm 0,095) C16:1 c9 - 4,289 (\pm 1,339) t12t14m + 0,25 (\pm 0,116) C18:1 t11 - 0,89 (\pm 0,442) t7t9m$	0,751	0,705
20:5 n3	$0,847 (\pm 0,254) - 0,02 (\pm 0,005) n6n3 - 0,31 (\pm 0,077) n3LPUFA - 0,133 (\pm 0,069) trans + 0,01 (\pm 0,005) C18:1 c9 - 0,17 (\pm 0,06) C16:1 c9$	0,622	0,565
22:6 n3	$0,08 (\pm 0,019) + 0,15 (\pm 0,058) C14:1 c9 - 0,09 (\pm 0,029) t9t11m - 0,002 (\pm 0,0007) n6n3 - 0,09 (\pm 0,032) C18:t6t8 - 0,008 (\pm 0,004) C18:1 c11$	0,692	0,646
n3-LCPUFA	$-2,975 (\pm 0,639) + 0,88 (\pm 0,166) C18:3 n3 + 0,12 (\pm 0,0181) C18:1 c9 - 0,83 (\pm 0,193) C16:1 c9 + 0,96 (\pm 0,329) DMA 16:0 - 0,91 (\pm 0,289) C18:1 t6t8 - 4,68 (\pm 2,391) t12t14m$	0,703	0,648
n3PUFA	$-3,71 (\pm 0,915) + 1,27 (\pm 0,237) C18:3 n3 + 0,172 (\pm 0,0259) C18:1 c9 - 1,37 (\pm 0,277) C16:1 c9 - 8,14 (\pm 3,421) t12t14m - 1,06 (\pm 0,414) C18:1 t6t8 + 1,06 (\pm 0,471) DMA 16:0$	0,731	0,681
n6/n3	$-16,479 (\pm 6,257) + 0,481(\pm 0,082) n6n3 + 0,519 (\pm 0,2047) n6PUFA + 16,659 (\pm 9,342) C20:1 c11$	0,606	0,572
18:2n6	$18,33 (\pm 2,849) - 13,87 (\pm 3,272) t9t11m - 13,07 (\pm 4,382) C17:1 c9 - 17,84 (\pm 10,144) t7t9m$	0,434	0,385
20:4 n6	$3,29 (\pm 0,348) - 32,88 (\pm 9,164) t12t14m$	0,258	0,238
Total PUFA	$24,20 (\pm 4,34) - 20,27 (\pm 4,996) t9t11m - 16,36 (\pm 6,647) C17:1 c9$	0,352	0,316
SFA	$33,225 (\pm 3,251) + 9,679 (\pm 4,649) C17:1 c9 + 8,481 (\pm 4,419) C22:4 n6$	0,182	0,136
cis9MUFA	$11,19 (\pm 4,667) + 5,67 (\pm 1,211) C16:1 c9 - 0,172 (\pm 0,105) C18:1 c9 + 5,9 (\pm 1,430) n3LPUFA + 0,32 (\pm 0,089) n6n3 + 10,88 (\pm 5,55) t7t9m - 8,83 (\pm 4,93) C20:1 c11$	0,376	0,342
18:1 c9	$23,79 (\pm 1,867) + 105,36 (\pm 27,579) t12t14m + 5,14 (\pm 2,338) C20:3 n6$	0,329	0,292

Tabela 10 – Equações de regressão múltipla para a previsão da composição em ácidos gordos totais da carne e frações polares e neutras da carne, quando se inclui ou não informação obtida com recurso à análise detalhada dos isómeros de CLA por HPLC.

	Com HPLC		Variáveis incluídas	Sem HPLC		
	R ²	R ² adj		R ²	R ² adj	Variáveis incluídas
Lípidos totais da carne						
CLAc9 <i>t11</i>	0.75	0.71	5) CLAc9 <i>t11</i> ; 18:1 <i>t11</i> ; CLAc11 <i>t13</i> ; 22:6n-3; 18:0.	0.49	0.45	3) 18:1 <i>t1</i> ; 22:6n-3; 18:2n-6.
18:1 <i>t11</i>	0.82	0.78	7) CLA total, CLAc10 <i>t12</i> , 20:2n6; n6:n3; <i>t11t13</i> ; 18:0; n-3PUFA.	0.62	0.57	4) 18:1 <i>t11</i> ; 20:2n-6; 15:0; DMA180
18:3n-3	0.75	0.71	6) 18:3n-3; 18:1 <i>c9</i> ; 16:1 <i>c9</i> ;T12 <i>t14</i> ; 18:1 <i>t11</i> ; <i>t7c9</i>	0.67	0.63	5) 18:3n-3; 18:1 <i>c9</i> ; 16:1 <i>c9</i> ; 20:5n-3
Lc-n3 FA	0.70	0.65	6) 18:3n-3; 18:1 <i>c9</i> ; 16:1 <i>c9</i> ; DMA16:0; 18:1 <i>t6-t8</i> ; T12 <i>t14</i>	0.67	0.62	5) 18:3n-3; 18:1 <i>c9</i> ; 16:1 <i>c9</i> ; DMA16:0; 18:1 <i>t6-t8</i> ;
n3-PUFA	0.73	0.68	6) 18:3n-3; 18:1 <i>c9</i> ; 16:1 <i>c9</i> ; T12 <i>t14</i> ; 18:1 <i>t6-t8</i> ; DMA16:0	0.64	0.60	4) 18:3n-3; 18:1 <i>c9</i> ; 16:1 <i>c9</i> ; SFA
n6/n3	0.61	0.57	3) n6/n3; n-6PUFA; 20:1 <i>c9</i>	*		
Fracção de lípidos polares						
CLA	0.85	0.81	9) <i>t11c13</i> ; <i>t11t13</i> ; 20:2n-6; 18:1 <i>t6-t8</i> ; 18:1 <i>t11</i> ; 20:5n-3; <i>t10c12</i> ; 22:6n3; 18:1 <i>c11</i>	0.72	0.66	6) CLAgc; 20:5n-3; 17:0; 22:6n-3; 18:1 <i>t16</i> ; 14:1 <i>c9</i>
18:1 <i>t11</i>	0.77	0.72	6) <i>t11c13</i> ; <i>t11t13</i> ; <i>t7c9</i> ; 20:2n-6, <i>c/t12,14</i> ; 18:1 <i>t11</i>	0.73	0.68	7) 18:1 <i>t11</i> ; 22:4n-6, 20:4 n-6; n6/n3; 20:2 n-6; 16:1 <i>c9</i>
18:3n-3	0.80	0.74	8)DMA-16:0; iso-16:0; 16:1 <i>c9</i> ; 17:0; 18:1 <i>c11</i> ; 18:3n-3; 22:6n-3; <i>t11c13</i>	0.85	0.80	9) DMA-16:0; 18:1 <i>c11</i> ; 17:0; 22:6n-3; 18:3n-3; iso-17:0; 14:1 <i>c9</i> ;DMA-18:0; 20:3n-3
LC-n3 FA	0.82	0.77	8) 18:1 <i>c12</i> ; <i>c/t12,14</i> ; 16:1 <i>c7</i> ; 18:0; <i>t8c10</i> ; 18:1 <i>c9</i> ; n-3 PUFA; <i>t8t10</i>	0.56	0.54	2) n6/n3; 18:1 <i>c12</i>
n-3 PUFA	0.69	0.65	4) n6/n3; 18:0; 20:3n-6; 20:5n-3	0.69	0.65	4) n6/n3; 18:0; 20:3n-6; 20:5n-3
Fracção de lípidos neutros						
CLA	0.83	0.79	7) <i>t9t11</i> , 17:0; 20:3n-6; <i>t7c9</i> ; 14:1 <i>c9</i> 20:2n-6; <i>t11c13</i>	0.67	0.62	5) CLAgc; 20:2n-6; 20:0; 17:0; 22:5n-3
18:1 <i>t11</i>	0.90	0.88	7) <i>t11c13</i> ; n6/n3 <i>t10c12</i> ; 20:2n-6; 18:1 <i>t11</i> 16:1 <i>c7</i> ; 20:5n3	0.74	0.69	6) CLAgc; DMA18:0; 18:0 20:2n-6; 22:5n-3; 18:3n-3
18:3n-3	0.37	0.31	4) DMA-16:0; 22:5n-3 ;16:0; 22:6n3	*		

5. DISCUSSÃO

A escolha dos eritrócitos como objetivo de estudo deveu-se ao facto de, além de serem facilmente obtidos, não estarem tão sujeitos às variações circadianas e de variações pontuais da dieta e ingestão. Sendo os lípidos dos eritrócitos maioritariamente fosfolípidos constituintes das membranas celulares, apresentam um “turn-over” mais lento e poderão mais fielmente refletir o padrão de AG depositados nos lípidos estruturais do músculo. Contudo, os lípidos intramusculares são também constituídos por uma fração variável de triacilgliceróis depositados em adipócitos situados entre as miofibrilhas musculares, que apresentam uma composição em ácidos gordos distinta dos lípidos estruturais musculares. Assim, as variações de gordura intramuscular da carne introduzem alterações importantes na composição de AG da carne (Wood *et al.*, 2008), o que poderá diminuir a utilidade de eritrócitos como elemento indicador da composição de AG da carne. Contudo, considerando que se pretende monitorizar a deposição de ácidos gordos polinsaturados (i.e. ómega-3) na carne e que estes são seletivamente depositados nos lípidos estruturais (Jerónimo *et al.*, 2011), a composição em AG dos eritrócitos poderá ser um bom indicador da deposição destes AG na carne. Por outro lado, a deposição de CLA dá-se preferencialmente nos triglicéridos (Jerónimo *et al.*, 2011), pelo que se pode esperar menor previsibilidade da deposição destes isómeros através da composição em AG dos eritrócitos. Para testar estas hipóteses e avaliar o efeito das variações da gordura intramuscular, optámos assim por separar as frações de lípidos neutros (maioritariamente triacilgliceróis) e lípidos polares (fosfolípidos) da carne, e compará-las com a dos eritrócitos.

A comparação do perfil de ácidos gordos dos eritrócitos com a da composição em ácidos gordos das frações dos lípidos carne (Tabela 1) confirma que existem diferenças marcantes, mesmo entre os eritrócitos e os lípidos polares da carne. Encontramos relativamente poucas publicações com perfil de ácidos gordos dos eritrócitos de bovinos, sendo que a maioria apresentava a composição detalhada de cada classe de fosfolípidos, onde se evidencia grandes diferenças entre elas. De qualquer modo, fica a informação que a composição em AG dos eritrócitos poderá ser muito variável com as condições experimentais e eventualmente com os métodos analíticos utilizados. Destaca-se em particular a ausência de 24:0 e 24:1 nos nossos dados em oposição ao referido em outros trabalhos (Stangl *et al.*, 1999; Sako *et al.*, 1989; O’Kelly, 1979). Estes AG muito longos encontram-se associados à esfingomielina que pode constituir cerca 5% do total de fosfolípidos. Contudo, para se obter uma derivatização completa dos AG associados à esfingomielina, os tempos de reação de derivatização em meio

ácidos deverão ser muito longos (Christie, 1982). Assim, o nosso método, que envolvia apenas 10 minutos de derivatização em meio ácido, não analisou os AG associados à esfingomielina, justificando a ausência de 24:0 e 24:1 nas nossas amostras.

Apesar das diferenças marcantes observadas entre a composição de AG dos eritrócitos e da carne, observou-se que muitas correlações significativas, quer positivas quer negativas, entre eles (Tabelas 2,3 e 4), indicando que a variação na concentração de AG nos eritrócitos estava associada à variação de AG das frações da carne em particular para os intermediários da biohidrogenação (18:1 *trans* e isômeros de CLA) para todas as frações e também dos ácidos gordos n-3 na fração de lípidos polares.

Trabalhos muito recentes, publicados já depois do início do nosso trabalho, encontraram também correlações elevadas entre os isômeros 18:1 *trans* dos eritrócitos e do músculo e tecido adiposo em bovinos (Aladia *et al.*, 2012; Mapiye *et al.*, 2012). Contudo estes estudos estão focados apenas nos 18:1 *trans* e quanto sabemos não existe informação publicada sobre eventuais correlações entre CLA e AG n-3 nos eritrócitos e no músculo.

A existência de correlações significativas entre alguns AG dos eritrócitos da carne apenas nos indica que existe um potencial de utilização dos AG dos eritrócitos para prever os dos da carne. Para explorar este potencial tem de aplicar técnicas de regressão multivariada.

As equações de regressão obtidas por nós precisam ainda de ser sujeitas a um processo mais cuidadoso de refinação tomando em consideração a análise de resíduos, intervalos de previsão, correções para a co-linearidade das variáveis explicativas e finalmente validação com dados externos à base de dados utilizada para as gerar. Contudo permitem já concluir que será possível prever a composição de AG da carne como o CLA e 18:1 *trans-11*, 18:3 n-3 e total de n-3 PUFA a partir da informação dos AG dos eritrócitos.

Esperava-se, que os R^2 fossem francamente mais elevados para a previsão dos AG dos lípidos polares do músculo do que dos lípidos neutros, mas isto só é evidente para o 18:3 n-3. Para os intermediários da biohidrogenação com maior interesse (o 18:1 *trans-11* e CLA *cis-9,trans-11*) os R^2 são elevados quer para os lípidos neutros quer para os polares.

O processo de seleção das variáveis a incluir nas equações é crítico para obter equações de previsão que tenham potencial prático. A maioria dos dados são obtidos por cromatografia gasosa (GC), mas a informação detalhada sobre os isômeros de CLA são obtidos por uma técnica complementar por cromatografia líquida (HPLC). Muitas das correlações significativas observadas por nós envolviam os isômeros de CLA. Dado que a técnica

completar de HPLC complica o processo analítico, resolvemos testar se poderíamos obter equações equiparáveis sem usar a informação da composição detalhada dos isómeros de CLA. Contudo, conclui-se que para a generalidade dos AG de interesse a inclusão das variáveis obtidas por HPLC melhorava substancialmente as equações obtidas. Isto verificou-se inclusive para a previsão dos AG n-3, apesar aqui as diferenças não serem tão marcantes como na previsão dos intermediários de biohidrogenação. As relações entre isómeros de CLA e os outros intermediários da biohidrogenação (na sua maioria isómeros 18:1 *trans*) são naturais já que são todos se originam no decurso da metabolização ruminal dos AG da dieta. Não é assim surpreendente que a informação da composição detalhada dos isómeros de CLA, melhore as equações de previsão do teor de CLA *cis-9,trans-11* e 18:1 *trans-11* presente na carne.

O reconhecimento de que é possível gerar equações de previsão do teor de CLA, 18:1 *trans-11* e AG n-3 da carne a partir da análise de eritrócitos do sangue abre perspectivas importantes para produção de carnes diferenciadas pelo seu teor em ácidos gordos.

Assim, esta abordagem poderá ser incorporada no sistema de controlo de qualidade da produção de modo a garantir que os animais sejam enviados para abate quando já possuem um teor mínimo de por exemplo AG n-3 ou CLA.

6. CONCLUSÃO

Atualmente, os consumidores prestam uma atenção crescente com a composição da gordura ingerida através da alimentação, seguindo as recomendações nutricionais no sentido da diminuição da ingestão de SFA e TFA e do aumento da ingestão de PUFA, principalmente de n-3 PUFA. Neste contexto, verifica-se uma crescente tendência para a produção de carnes diferenciadas pelo valor nutricional da sua gordura. As estratégias de produção e controlo de qualidade destes produtos ganharia muito com o desenvolvimento de métodos não invasivos de previsão *ante-mortem* da composição em AG da carne como o CLA e 18:1 *trans-11*, 18:3 n-3 e total de n-3 PUFA. A abordagem explorada neste trabalho de prever a composição de AG da carne a partir da informação dos AG dos eritrócitos é muito promissora. Verificamos que a inclusão da informação detalhada dos isómeros de CLA obtida por HPLC melhora substancialmente as equações de regressão linear múltipla obtidas na previsão da composição do perfil de AG do músculo. Esta abordagem merece ser aprofundada, alargando a amostragem a animais produzidos comercialmente, afinando e validando os modelos que entretanto se obtenham.

7. BIBLIOGRAFIA

- Aldai, N., Murray, B.E., Oliván, M., Martínez, A., Troy, D.J., Osoro, K., & Nájera, A.I. (2006b). The influence of breed and mh-genotype on carcass conformation, meat physic-chemical characteristics, and the fatty acid profile of muscle from yearling bulls. *Meat Science*, 72, 486-495.
- Aldai N., Dugan M. E.R. , Rolland D. C. , Aalhus J. L. (2012). Red blood cell trans-18:1 isomeric profile correlates with subcutaneous fat and muscle profiles in beef cattle. *Meat Science* 91, 203–206
- Arab, L., Akbar, J. (2002). Biomarkers and the measurement of fatty acids. *Health Nutr* 5:865–871
- Bauchart, D., Legay-Carmier, E., Doreau, M. (1990a). Ruminant hydrolysis of dietary triglycerides in dairy cows fed lipid-supplemented diets. *Reprod. Nutr. Dev.*, 30 (Suppl, 2): 187s.
- Bauchart, D. (1993). Lipid absorption and transport in ruminants. *Journal of Dairy Science*, 76, 3864–3881.
- Bauman, D.E., Baumgard, L.H., Corl, B.A., and Griinari, J.M. (1999). Biosynthesis of Conjugated Linolenic Acid in Ruminants, *Proc. Am. Soc. Anim. Sci.*
- Bauman, D.E. and Griinari, J.M. (2001). Regulation and nutritional manipulation of milk fat: Low fat milk syndrome. *Livestock Prod. Sci.*
- Beare-Rogers, J. L.; Gray, B.; Hollywood, R. (1979). The linoleic acid and trans fatty acid of margarines. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 32, p. 1805-1809.
- Belda, M. C. R.; Pourchet-Campos, M. (1991). A. Ácidos graxos essenciais em nutrição: uma visão atualizada. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 11, n.1, p.5-35.
- Belury, M.A. (2003). Conjugated Linoleic Acids in Type 2 Diabetes Mellitus: Implications and Potential Mechanisms, in *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research* (Sebedio, J.L., Christie, W.W., and Adlof, R.O., eds.), Vol. 2, pp. 302–315, AOCS Press, Champaign.
- Beam, T.M., Jenkins, T.C., Moate, P.J. , Kohn, R.A., and Palmquist, D.L. (2000). Effects of amount and source of fat on the rate of lipolysis and bihydrogenation of fatty acids in ruminal contents. *Journal of Dairy Science*, v. 81, p. 2540-2559.
- Bessa R., Alves S., Portugal P., Jerónimo E., (2006). Métodos Laboratoriais. Disponível em: http://www.inrb.pt/fotos/editor2/inia/prestacao_de_servicos_analises/lml_metodos_laboratoriais.pdf

- Bessa, R. J. B., Lourenço, M., Portugal, P. V. and Santos-Silva, J. (2008). Effects of previous diet and duration of soybean oil supplementation on light lamb carcass composition, meat quality and fatty acid composition. *Meat Science*, 80, 1100-1105.
- Bloj, B., R. D. Morero, R. N. Farias, and R. E. Trucco, (1973). Membrane lipid fatty acids and regulation of membrane-bound enzymes: Allosteric behavior of erythrocyte Mg⁺⁺-ATPase, (Na⁺ + K⁺)-ATPase and acetylcholinesterase from rats fed different fat-supplemented diets. *Biochim. Biophys. Acta*. 311: 67-79
- Bole, M.R., Hess, B.W., Means, W.J., Moss, G.E., & Rule, D.C. (2002). Feeding lambs high-oleate or high-linoleate safflower seeds differentially influences carcass fatty acid composition. *Journal of Animal Science*, 80, 609-616.
- Brasil. Ministério da Agricultura e do abastecimento. (1999). Curso conhecendo a carne que você consome. Campo Grande, MS. Qualidade da carne bovina. Embrapa Gado de Corte. 25p.
- Bressan, M. C., Rossato, L. V., Rodrigues, E. C., Alves, S. P., Bessa, R. J. B., Ramos, E. M., Gama, L. T. (2010). Genotype × environment interactions for fatty acid profiles in *Bos indicus* and *Bos taurus* finished on pasture or grain. *American Society of Animal Science*.
- British Department of Health (1994). Nutritional aspects of cardiovascular disease. Report on Health and Social Subjects N° 46. London: HMSO.
- British Nutrition Foundations (1994). *Unsaturated fatty acids: nutritional and physiological significance; the report of the British Nutrition Foundation's Task Force*. London: Chapman & Hall, 211p.
- Champe, P.C., Harvey, R.A. (1997). *Bioquímica ilustrada*. Ed. Artes Médicas, Porto Alegre, RS. 446p.
- Chizzolini, R., Zanardi, E., Dorigoni, V., & Ghidini, S. (1999). Calorific value and cholesterol content of normal and low-fat meat and meat products: review. *Trends in Food Science and Technology*, 10, 119-128.
- Choi, N.-J., Imm, J.Y., Oh, S., Kim, B.-C., Hwang, H.-J., & Kim, Y.J. (2005). Effect of pH and oxygen on conjugated linoleic acid (CLA) production by mixed rumen bacteria from cows fed high concentrate and high forage diets. *Animal Feed Science and Technology*, 123- 124(2), 643-653.
- Christie W., VII. (1981). The cellular constituents of blood in: Christie W. (Ed.), *Lipid Metabolism in Ruminant Animals*, Pergamon Press, England, pp. 136–140.
- Christie, W. W. (1982). *Lipid analysis*, Pergamon Press: Oxford, cap. 2.
- Costa, P., Roseiro, L.C., Partidário, A., Alves, V., Bessa, R.J.B., Calkins, C., & Santos, C. (2006). Influence of slaughter season and sex on fatty acid composition, cholesterol and alfatocopherol contents on different muscles of Barrosã-PDO veal. *Meat Science*, 72, 130-139.

Curi, R.; Pompéia, A., Miyasaka C.K., Procopio, J. (2002). Entendendo a Gordura: os ácidos Graxos. Manole, Barueri – SP, p. 138.

Dannenberger, D., Nuernberg, K., Nuernberg, G., Scollan, N., Steinhart, H., & Ender, K. (2005). Effect of pasture vs. concentrate diets on CLA isomer distribution in different tissue lipids of beef cattle. *Lipids*, 40, 589-598.

Dawson, R. M. C. and Kemp, P. (1970). Biohydrogenation of dietary fats in ruminants. In *Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant*, ed. A. T. Phillipson, Oriel Press, Newcastle-upon-Tyne, pp. 504-18.

Demeyer, D., Doreau, M. (1999). Targets and procedures for altering ruminant meat and milk lipids. *Proceeding of the Nutrition Society*, v. 58, p. 593-607.

Descalzo, A.M., Insani, E.M., Biolatto, A., Sancho, A.M., García, P.T., Pensel, N.A., & Josifovich, J.A. (2005). Influence of pasture or grain-based diets supplemented with vitamin E on antioxidant/oxidative balance of Argentine beef. *Meat Science*, 70, 35-44.

De Smet, S., Raes, K. and Demeyer, D. (2004). Meat fatty acid composition as affected by fatness and genetic factors: a review. *Animal Research*, 53, 81-98.

Dhiman, T.R., Anand, G.R., Satter, L.D., & Pariza, M.W. (1999). Conjugated linoleic acid content of milk from cows fed different diets. *Journal of Dairy Science*, 82, 2146-2156

Doreau, M., & Ferlay, A. (1994). Digestion and utilization of fatty acid by ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 45, 379-396.

Duckett, S.K., Andrae, J.G., & Owens, F.N. (2002). Effect of high-oil corn or added corn oil on ruminal biohydrogenation of fatty acids and conjugated linoleic acid formation in beef steers fed finishing diets. *Journal of Animal Science*, 80, 3353-3360.

Enser M., Hallett K., Hewitt B., Fursey G.A.J., Wood J.D. (1996). Fatty acid content and composition of English beef, lamb and pork at retail, *Meat Sci.* 42, 443–456.

French, P., Stanton, C., Lawless, F., O’Riordan, E.G., Monahan, F.J., Caffrey, P.J., & Moloney, A.P. (2000). Fatty acid composition, including conjugated linoleic acid of intramuscular fat from steers offered grazed grass, grass silage, or concentrated based diets. *Journal of Animal Science*, 78, 2849–2855.

Fritsche, J., & Steinhart, H. (1998a). Analysis, occurrence, and physiological properties of *trans* fatty acids (TFA) with particular emphasis on conjugated linoleic acid isomers (CLA) – a review. *Fett/Lipid* 100(6), 190-210.

- Gandemer G., (1999). Lipids and meat quality: lipolysis, oxidation, Maillard reaction and flavour, *Sci. Aliments* 19, 439–458.
- Ganji, S.H., Kamanna, A.M., & Kashyap, M.L. (2003). Niacin and cholesterol: role in cardiovascular disease (review). *Journal of Nutritional Biochemistry*, 14, 298-305.
- Givens, D.I. (2005). The role of animal nutrition in improving the nutritive value of animal-derived foods in relation to chronic disease. *Proceedings of the Nutrition Society*, 64, 395-402
- Givens, D. I., Kliem, K. E., & Gibbs, R. A. (2006). The role of meat as a source of n _ 3 polyunsaturated fatty acids in the human diet. *Meat Science*, 74, 209–218.
- Griffin, B.A. (2008). How relevant is the ratio of dietary n-6 to n-3 polyunsaturated fatty acids to cardiovascular disease risk? Evidence from the Optilip study. *Current Opinion in Lipidology*, 19, 57-62.
- Harfoot, C. G., & Hazelwood, G. P. (1997). Lipid metabolism in the rumen. In *The rumen microbial ecosystem* (pp. 382–426). London (UK): Elsevier Science Publishing.
- Havel, Vaclav. (1985). "The Power of the Powerless." In Havel, Vaclav, et al., *The Power of the Powerless: Citizens Against the State in Central-Eastern Europe*, ed. John Keane. London: Hutchinson
- Honstra, G., Bart, C. A. Galli, C., Mensink, R. P., Mutanen, M., Riemersma, R. A., Roberfroid, M., Salminen, K.; Vansant, G., Verschuren, P. M. (1998). Functional food science and the cardiovascular system. *British Journal of Nutrition*, suppl. 1 S113-S146.
- Horwitz, A. F., M. E. Hatten, and M. M. Burger. (1974). Membrane fatty acid replacements and their effect on growth and lectin-induced agglutinability. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 71: 3115-3119.
- Hu, F.B., Manson, J.E., & Willett, W.C. (2001). Types of dietary fat and risk of coronary heart disease: a critical review. *Journal of American College of Nutrition*, 20, 5-19.
- INE (2007). Estatísticas agrícolas. Instituto Nacional de Estatística. http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0000210&contexto=bd&selTab=tab2.
- Jahreis, G., Fritsche, J., & Kraft, J. (1999). Species-dependent, seasonal, and dietary variation of conjugated linoleic acid in milk. In M.P. Yurawecz, M. Mossoba, J.K. Kramer, G. Nelson, & M.W. Pariza (Eds.), *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*, Vol. 1. (pp. 215-225). Champaign, IL, USA: AOCS Press.
- Jahreis, G., & Kraft, J. (2002). Sources of conjugated linoleic acid in the human diet. *Lipid Technology*, 14, 29-32.

- Jerónimo, E., Alves, S. P., Alfaia, C. M., Prates, J. A. M., Santos-Silva, J., Bessa, R. J. B. (2010). Biohydrogenation intermediates are differentially deposited between polar and neutral intramuscular lipids of lambs. Submitted to *European Journal of Lipid Science and Technology*.
- Jiménez-Colmenero, F. (2007). Healthier lipid formulation approaches in meat-based functional foods. Technological options for replacement of meat fats by non-meats fats: review. *Trends in Food Science and Tecnology*, 18, 567-578.
- Katan, M.B., Zock, P.L., & Mensink, R.P. (1994). Effects of fats and fatty acid on blood lipids in humans: an overview. *American Journal of Clinical Nutrition*, 60, 1017-1022
- Keeney, M. (1970). Lipid metabolism in the rumen. In *Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant*, ed, A. T. Phillipson. Oriel Press, Newcastle-upon-Tyne, pp. 489-503.
- Kepler, C. R. and Tove, S. B. J. (1967). *Biol Chen*, 242. 5686-5692.
- Kraft, J., Kramer, J.K.G., Schoene, F., Chambers, J.R., Jahreis, G. (2008). Extensive analysis of longchain polyunsaturated fatty acids, CLA, *trans*-18:1 isomers, and plasmalogenic lipids in different retail beef types. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 4775-4782.
- Kritchevsky, D. (2003) Conjugated Linoleic Acids in Experimental Atherosclerosis, in *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research* (Sebedio, J.L., Christie, W.W., and Adlof, R.O., eds.), Vol. 2, pp. 292–301, AOCS Press, Champaign.
- Kris-Etherton, Penny, M.Y.U., Shaomei, (1997). Individual fatty acids effects on plasma lipids and lipoproteins; human studies. *The New England Journal of Medicine*, v. 337, n. 21, p. 1491-1499.
- Lee, M.R.F., Tweed, J.K.S., Dewhurst, R.J., & Scollan, N.D. (2006). Effect of forage: concentrate ratio on ruminal metabolism and duodenal flow of fatty acids in beef steers. *Anim. Science*, 82, 31-40.
- Lourenço, M., Van Ranst, G., Vlaeminck, B., De Smet, S., & Fievez, V. (2008). Influence of different dietary forages on the fatty acid composition of rumen digesta as well as ruminant meat and milk. *Animal Feed Science Technology*, 145(1–4), 418–437.
- Lorenzen, C.L., Golden, J.W., Martz, F.A., Grün, I.U., Eilersieck, M.R., Gerrish, JR., & Moore, K.C. (2007). Conjugated linoleic acid content of beef differs by feeding regime and muscle. *Meat Science*, 75, 159–167.
- Maia M. R. G.; Chaudhary L. C.; Figueres L.; Wallace R. J. (2007). *Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen*. *Antonie van Leeuwenhoek* 91:303–314

Mapiye C. ; Dugan M.E.R. ; Turner T.D. ; Rolland D.C.; Basarab J.A.; Baron V.S.; McAllister T.A.; Block H.C. ; Uttaro B. ; Aalhus J.L. (2012). Relationships of *trans* 18:1 isomers between red blood cells and beef tissues in steers fed red clover silage with/without flaxseed

.Marckmann, P. (1999). Footprint of fish: docosahexaenoic acid (DHA) in adipose tissue (Editorial). *Nutrition* 15:407–408

Mir, P.S., McAllister, T.A., Scott, S., Aalhus, J., Baron, J., McCartney, D., Charmley, E., Goonewardene, L., Basarab, J., Okine, E., Weselake, R.J., & Mir, Z. (2004). Conjugated linoleic acid – enriched beef production. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79 (suppl), 1207-1211.

Mir, Z., Goonewardene, L.A., Okine, E., Jaegar, S., & Scheer, H.D. (1999). Effect of feeding canola oil on constituents, conjugated linoleic acid (CLA) and long chain fatty acids in goats milk. *Small Ruminant Research*, 33, 137-143.

Moloney ,A.P., Monahan, F.J., Noci, F., Murray, B., & Troy, D.J. (2004). Enhancement of the nutritional value and eating quality of beef. In Beef Production Series N° 64. (pp. 1-33). Dunsany, Co. Meath, Ireland: Grange Research Centre.

Monteiro, A.C.G., Santos-Silva, J., Bessa, R.J.B., Navas, D.R., & Lemos, J.P.C. (2006). Fatty acid composition of intramuscular fat of bulls and steers. *Livestock Science*, 99, 13-19.

Mulder, E., and Van Deenen, L. L. M. (1965). Metabolism of red-cell lipids: I. Incorporation in vitro of fatty acids into phospholipids from mature erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta*. 106: 106- 117.

Nürnberg K., Wegner J., Ender K.. (1998). Factors influencing fat composition in muscle and adipose tissue of farm animals. *Livestock Production Science*, 56, 145–156.

Nuernberg, K., Dannenberger, D., Nuernberg, G., Ender, K., Voigt, J., Scollan, N.D., Wood, J.D., Nute, G.R., & Richardson, R.I. (2005). Effect of a grass-based and a concentrate feeding system on meat quality characteristics and fatty acid composition of longissimus muscle in different cattle breeds. *Livestock Production Science*, 94, 137-147.

Nuernberg, K., Dannenberger, D., Ender, K., & Nuernberg, G. (2007). Comparison of different methylation methods for the analysis for the analysis of conjugated linoleic acid isomers by silver-ion HPLC in beef lipids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 598-602.

O'Kelly, J. C. (1979). The lipid composition of erythrocytes in European cattle and buffalo steers. *Lipids*, 14, 983–988.

Okeudo, N.J. & Moss, B.W. (2007). Intramuscular lipid and fatty acid profile of sheep comprising four sex-types and seven slaughter weights produced following commercial procedure. *Meat Science*, 76, 195-200.

- Palmquist, D.L.; Mattos, W.R.S.(2006). Metabolismo de lipídeos. In: Berchielli, T.T. et al. Nutrição de ruminantes. Jaboticabal: FUNEP. Cap.10, p.287-310.
- Pariza, M.W., Park, Y., and Cook M.E. (2001). The Biologically Active Isomers of Conjugated Linoleic Acid, *Progr. Lipid Res.* 40, 283–298.
- Park, C. B., Miller, R. D., and Xia, J. (1999). Multichannel analysis of surface waves (MASW): *Geophysics*, 64, 800-808.
- Parodi, P.W. (1999). Conjugated Linoleic Acid and Other Anticarcinogenic Agents of Bovine Milk Fat. *Journal Dairy Science*, 82: 1339-1349.
- Pompéia, C., Procópio, J., Curi, R. (1999). Fatty acids and the immune system. *Rev. Bras. Cienc. Farmac.*, v. 35, n. 2, p. 165-194.
- Prates, J.A.M., & Bessa, R.J.B. (2009). *Trans* and *n*-3 fatty acids. In Nollet, L.M.L., & Toldrá, F.(Eds.), *Handbook of Muscle Foods Analysis*, Vol. 1. (pp. 399-417)
- Raes, K., & Smet, S. D. (2001). Effect of double-muscling in Belgian Blue young bulls on the intramuscular fatty acid composition with emphasis on conjugated linoleic acid and polyunsaturated fatty acids. *Animal Science*, 73, 253–260.
- Raes, K., De Smet, S., & Demeyer, D. (2004). Effect of dietary fatty acids on incorporation of long chain polyunsaturated fatty acids and conjugated linoleic acid in lamb, beef and pork meat: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 113(1-4), 119-221.
- Riboli, E., Ronnholm, H., Saracci, R. (1987). Biological markers of diet. *Cancer Surv* 6:685–718
- Realini, C.E., Duckett, S.K., Brito, G.W., Rizza, M.D., & De Mattos, D. (2004). Effect of pasture vs. concentrate feeding with or without antioxidants on carcass characteristics, fatty acid composition, and quality of Uruguayan beef. *Meat Science*, 66, 567-577.
- Reed, C. F. (1968). Phospholipid exchange between plasma and erythrocytes in man and the dog. *J. Clin. Invest.*, 47: 749-760.
- Renooij, W., L. M. G., Van Golde, R. F. A., Zwaal, B. Roelofsen, and Van Deenan, L. L. M. (1974). Preferential incorporation of fatty acids at the inside of human erythrocyte membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 363: 287 - 292
- Renooij, W., L. M. G. Van Golde, R. F. A. Zwaal, and Van Deenen L. L. M. (1976). Topological asymmetry of phospholipid metabolism in rat erythrocyte membranes. *Eur. J. Biochem.* 61: 53-58.

- Rhee, K.S. (2000). Fatty acids in meat and meat products. In C.K. Chow (Eds.), *Fatty Acids in Foods and Their Health Implications*. (pp. 83-108). New York, Basel: Marcel Dekker, Inc
- Roos, N.M., Siebelink, E., Bot, M.L., Van Tol, A., Schouten, E.G., Katan, M.B. (2002). Trans monounsaturated fatty acids and saturated fatty acids have similar effects on postprandial flow-mediated vasodilation. *Eur J Clin Nutr*;56(7):674-679.
- Rymer, C., & Givens, D.I. (2005). *N*-3 Fatty acid enrichment of edible tissue of poultry: a review. *Lipids*, 40, 121–130.
- Sacks, F.M. and Katan, M. (2002). Randomised clinical trials on the effects of dietary fat and carbohydrate on plasma lipoproteins and cardiovascular disease. *American Journal of Medicine* 113: 13S-24S
- Sako, T., Takeda, S., Shibuya, M., Koyama, H., Uchino, T., Motoyoshi, S. (1989). Seasonal changes in the phospholipids and fatty acid composition on the bovine erythrocyte membrane. *Jpm. J. Sci.* 51(6): 1243-1245.
- Santos-Silva, J., Bessa, R.J., & Santos-Silva, F. (2002). Effect of genotype, feeding system and slaughter weight on the quality of light lambs. II. Fatty acid composition of meat. *Livestock. Production Science*, 77(2-3), 187-194.
- Schroeder, G.F., Gagliostro, G.A., Bargo, F., Delahoy, J.E., & Muller, L.D. (2004). Effects of fat supplementation on milk production and composition by dairy cows on pasture: a review. *Livestock Production Science*, 86, 1-18.
- Scollan, N., Hocquette, J.-F., Nuernberg, K., Dannenberger, Dirk, Richardson, I., & Moloney, A. (2006). Innovations in beef production systems that enhance the nutritional and health value of beef lipids and their relationship with meat quality. *Meat Science*, 74, 17–33.
- Shohet, S. B. (1970). Release of phospholipid fatty acid from human erythrocytes. *J. Clin. Invest.* 49: 1668-1678.
- Shohet, S. B., and Nathan, D. G.. (1970). Incorporation of phosphatide precursors from serum into erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 202: 202-205.
- Sierra, V., Aldai, N., Castro, P., Osoro, K., Coto-Montes, A., & Oliván, M. (2008). Prediction of the fatty acid composition of beef by near infrared transmittance spectroscopy. *Meat Science*, 78, 248-255.
- Sinclair, L.A. (2007). Nutritional manipulation of the fatty acid composition of sheep meat: a review. *Journal of Agricultural Science*, 145, 419–434.

- Smith, S. B., Lunt, D. K., Chung, K. Y., Choi, C. B., Tume, R. K., Zembayashi, M. (2006). Adiposity, fatty acid composition, and delta-9 desaturase activity during growth in beef cattle Stephen B. *Animal Science Journal* 77, 478–486
- Stangl G. I.; Schwarz F. I.; Kirchgeßner. (1999). Moderate long-term cobalt-deficiency affects liver, brain and erythrocyte lipids and lipoproteins of cattle. *Nutrition Research*, Vol. 19. No. 3, pp. 415-427.
- Steen, R.W.J., & Porter, M.G. (2003). The effects of high-concentrate diets and pasture on the concentration of conjugated linoleic acid in beef muscle and subcutaneous fat. *Grass and Forage Science*, 58, 50-57.
- Stockdale, C. R., Walker, G. P., Wales, W.J., Dalley, D. E., Birkett, A., Shen, Z., Doyle, P.T. (2003). Influence of pasture and concentrates in the diet of grazing dairy cows on the fatty acids composition of milk. *Journal of Dairy Research*. v. 70, p. 267-276.
- Turatii, J.M., Gomes, R.A.R., Athié, I. (2002). *LIPÍDEOS: Aspectos funcionais e novas tendências*. Campinas: ITAL, 78p.
- Valsta, L.M., Tapanainen, H., & Männistö, S. (2005). Meat fats in nutrition. *Meat Science*, 70, 525-530.
- Van Staveren, W.A., Deurenberg, P., Katan, M.B., Burema, J., Groot, LCPGM, Hoffmans, MDAF. (1986). Validity of the fatty acid composition of subcutaneous fat tissue microbiopsies as an estimate of the long-term average fatty acid composition of the diet of separate individuals. *Am J Epidemiol* 123:455–463
- Van Nevel, C.J., Demeyer, D.I., (1996). Effect of pH on bihydrogenation of polyunsaturated fatty acids and their ca-salts by rumen microorganisms in vitro. *Archives of Animal Nutrition*, v. 49, n.2, p.151-157.
- Webb, E.C., & O'Neill, H.A. (2008). The animal fat paradox and meat quality: review. *Meat Science*, 80, 28-36.
- WHO (2003). Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation. WHO Technical Report Series n° 916. Geneva, World Health Organization.
- Wood, J.D., Enser, M., Fisher, A.V., Nute, G.R., Sheard, P.R., Richardson, R.I., Hughes, S.I., Whittington, F.M. (2008). Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: a review. *Meat Science*, 78, 343–358.
- Zeleniuch-Jacquotte, A., Chajès, V., Van Kappel, A.L., Riboli, E., Toniolo, P. (2000). Reliability of fatty acid composition in human serum phospholipids. *Eur J Clin Nutr* 54:367–372.

ANEXOS

ANEXO 1 – PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

Extracção dos Lipídios Totais

Preparativos:

Na véspera:

- Colocar os balões de Erlenmeyer sem tampa na estufa a 70°C com uma pinça;
- Pesar a amostra para os tubos de 16 ml que se guarda posteriormente no frio;
- Dobrar os filtros separadores de fases e os filtros normais;
- Preparar o Diclorometano:Metanol (2:1);
- Preparar o Cloreto de potássio ou Cloreto de sódio (0.8%);
- Preparar o Diclorometano:Metanol:Solução salina (0.8%) na proporção de 86:14:1.

No dia:

Retirar os balões de Erlenmeyer para o excicador. Colocar os balões de Erlenmeyer no excicador com as tampas. Colocar de novo os balões de Erlenmeyer com as tampas no excicador até serem utilizados.

Procedimento:

1. Pesar 500mg de músculo liofilizado para os tubos de vidro de 16ml;
2. Adicionar 2,5ml de metanol e deixar humedecer durante 5 minutos;
3. Agitar no vortex (10seg) e colocar no ultra-sons a agitar durante 5 minutos a 30°C;
4. Adicionar 5 ml de diclorometano, agitar no vortex (10seg) e levar novamente ao ultra-sons durante 10 minutos a 30°C;
5. Centrifugar para separar a fase sólida (10 minutos a 2500 rpm) e retirar o máximo de solvente para outro tubo (de 23ml), passando por um filtro normal;
6. Adicionar a fase sólida 7,5 ml de diclorometano:metanol (2:1);
7. Adicionar no vortex (10seg) e levar à agitação no ultra-sons durante 10 minutos a 30°C;
8. Centrifugar para separar a fase sólida (5 minutos a 2500rpm) e retirar o máximo de solvente para o tubo do passo 5 ; passando pelo filtro normal;
9. Adicionar a fase sólida 5 ml de diclorometano:metanol (2:1);
10. Agitar no vortex (10seg) e levar à agitação no ultra-sons durante 5 minutos a 30 °C;
11. Centrifugar para separar a fase sólida (10 minutos a 2500rpm) e retirar o máximo de solvente para o tubo do passo 5, passando pelo filtro normal;
12. Adicionar ao filtrado (tubo do passo 5) 3 ml de solução de Cloreto de potássio ou cloreto de sódio 0.8%, agitar no vortex (10seg) e centrifugar (5 minutos a 2500rpm);
13. Retirar a parte inferior (com pipeta de Pasteur ou com pipeta normal com pompete) passando por um filtro separador de fases (que se humedece com diclorometano) para:
 - Tubo de 23ml – análise de perfil de ácidos gordos
 - Erlenmeyers de 50ml previamente tarados – análise ponderal
14. Adicionar 4 ml de diclorometano:metanol:solução salina 0,8% (86:14:1) à fracção aquosa (fase superior) que ficou no tubo do passo 5;
15. Agitar no vortex (10seg), centrifugar (5 minutos a 2500rpm) e retirar a parte inferior que se adiciona ao tubo ou ao balão de Erlenmeyer do passo 13;

16. Levar os balões de Erlenmeyer ao evaporador rotativo a 40°C e o tubo ao evaporador de corrente de azoto a 37°C;
17. Colocar os balões de Erlenmeyer na estufa de vácuo a 70°C durante 2 horas. Retirar os balões de Erlenmeyer da estufa e colocar no exsiccador com as tampas e após 1 hora pesar.

Separação/Doseamento dos lipídios neutros e polares

1. Diluir a gordura total contida nos balões ou já guardada nos vials com 2ml de diclorometano;
2. Pesar 2 balões de 50ml por amostra, devidamente identificados e previamente preparados;
3. Molhar (activar) a coluna Sep-Pack com 2ml de diclorometano;
4. Colocar na coluna 2ml de amostra em diclorometano;
5. Eluir com 30ml de diclorometano – Separação dos lipídios neutros;
6. Injectar ar na coluna para retirar o resto do diclorometano;
7. Eluir (para outro balão) em seguida com 30 ml de metanol – separação dos lipídios polares;
8. Levar a coluna com 20ml de metanol e em seguida com 20 ml de diclorometano.
9. Proceder à evaporação dos solventes:
 - Lipídios neutros (diclorometano) - 40°C
 - Lipídios polares (metano) - 60°C
10. Deixar os balões num exsiccador durante a noite.
11. Pesar os balões.

Transesterificação combinada dos ácidos gordos totais

1. Pesar 250mg de amostra liofilizada e adicionar 1ml de tolueno;
2. Adicionar 100 µl do FAME C19:0 20mg/ml em *n*-hexano e agitar 1 minuto no vortex;
3. Adicionar 3ml de solução de metóxido de sódio 0,5 M e colocar na estufa a 50°C durante 30 minutos, deixar arrefecer à temperatura ambiente;
4. Adicionar 2 ml HCL/metanol (1/1,v/v), agitar em vortex (10seg) e colocar novamente na estufa a 50°C durante 10 minutos, deixar arrefecer à temperatura ambiente;
5. No fim da reacção adicionar 2 ml de água *Milli Q*;
6. Extrair com 2 x 3 ml hexano, usar vortex (10seg) e centrifugar (5 minutos a 2500 rpm) recolhendo os sobrenadantes para o tubo de 16ml;
7. Adicionar 0,5 g de sulfato de sódio anidro à fase orgânica e agitar em vortex (10seg);
8. Efectuar uma centrifugação rápida (5 minutos a 2500rpm) e aspirar o solvente para tubo graduado;
9. Filtrar por filtro de seringa hidrofóbico 0,45 µm;
10. Dividir em duas alíquotas de 1ml (1 vial para GC e 1 vial para HPLC);

ANEXO 2 - DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA TESE

DECLARAÇÃO

Nome _____

Endereço electrónico _____ Telefone _____ / _____

Número do Bilhete de Identidade _____

Título: Dissertação ☐ Tese ☐

Orientador(es)

_____ Ano de conclusão _____

Designação do Mestrado ou do ramo de conhecimento do Doutoramento

Nos exemplares das teses de doutoramento ou dissertações de mestrado entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito legal na Biblioteca Nacional e pelo menos outro para a Biblioteca da FMV/UTL deve constar uma das seguintes declarações:

1. É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
2. É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE/TRABALHO (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
3. DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO.

Faculdade de Medicina Veterinária da ULisboa, ____/____/____

Assinatura: _____